

**Hormonelle Regulation des Adenylatzyklasesystems
in der Rattenleber bei Diabetes mellitus**

Hubert Allgayer

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Forschergruppe Diabetes und der III. med. Abteilung
des Krankenhauses München-Schwabing
(Direktor: Prof. Dr.med. H. Mehnert)

Hormonelle Regulation des Adenylatzyklasesystems
in der Rattenleber bei Diabetes mellitus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hubert Allgayer
aus
Dillingen

1978

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Do. Dr.med. K.D. Hepp
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.med. H. Mehnert
Dekan:	Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.1.1979



INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Aufgabenstellung	2
3. Beschreibung der Aufgabenstellung	3
4. Lösungsweg	4
5. Ergebnisse	5
6. Diskussion	6
7. Zusammenfassung	7
8. Literaturverzeichnis	8
9. Anlagen	9
10. Schlusswort	10
11. Bibliographie	11
12. Anlagen	12
13. Zusammenfassung	13
14. Diskussion	14
15. Literaturverzeichnis	15
16. Anlagen	16
17. Schlusswort	17
18. Bibliographie	18
19. Anlagen	19
20. Zusammenfassung	20
21. Diskussion	21
22. Literaturverzeichnis	22
23. Anlagen	23
24. Schlusswort	24
25. Bibliographie	25
26. Anlagen	26
27. Zusammenfassung	27
28. Diskussion	28
29. Literaturverzeichnis	29
30. Anlagen	30
31. Schlusswort	31
32. Bibliographie	32
33. Anlagen	33
34. Zusammenfassung	34
35. Diskussion	35
36. Literaturverzeichnis	36
37. Anlagen	37
38. Schlusswort	38
39. Bibliographie	39
40. Anlagen	40
41. Zusammenfassung	41
42. Diskussion	42
43. Literaturverzeichnis	43
44. Anlagen	44
45. Schlusswort	45
46. Bibliographie	46
47. Anlagen	47
48. Zusammenfassung	48
49. Diskussion	49
50. Literaturverzeichnis	50
51. Anlagen	51
52. Schlusswort	52
53. Bibliographie	53
54. Anlagen	54
55. Zusammenfassung	55
56. Diskussion	56
57. Literaturverzeichnis	57
58. Anlagen	58
59. Schlusswort	59
60. Bibliographie	60
61. Anlagen	61
62. Zusammenfassung	62
63. Diskussion	63
64. Literaturverzeichnis	64
65. Anlagen	65
66. Schlusswort	66
67. Bibliographie	67
68. Anlagen	68
69. Zusammenfassung	69
70. Diskussion	70
71. Literaturverzeichnis	71
72. Anlagen	72
73. Schlusswort	73
74. Bibliographie	74
75. Anlagen	75
76. Zusammenfassung	76
77. Diskussion	77
78. Literaturverzeichnis	78
79. Anlagen	79
80. Schlusswort	80
81. Bibliographie	81
82. Anlagen	82
83. Zusammenfassung	83
84. Diskussion	84
85. Literaturverzeichnis	85
86. Anlagen	86
87. Schlusswort	87
88. Bibliographie	88
89. Anlagen	89
90. Zusammenfassung	90
91. Diskussion	91
92. Literaturverzeichnis	92
93. Anlagen	93
94. Schlusswort	94
95. Bibliographie	95
96. Anlagen	96
97. Zusammenfassung	97
98. Diskussion	98
99. Literaturverzeichnis	99
100. Anlagen	100

Meinen Eltern

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

I. Einleitung	1 - 6
II. Material und Methoden	
1. Erzeugung und Behandlung des experimentellen Diabetes an Ratten	7
1.1. Auswahl der Tiere	7
1.2. Erzeugung des Diabetes	7 - 8
1.3. Behandlung des Diabetes mit Insulin	8 - 9
2. Präparation der Leber- plasmamembranen	9 - 10
3. Markerenzyme und Protein- bestimmung	10
4. Bestimmung der Bindung von Insulin und Glukagon an die Plasmamembran und der Plasmaspiegel beider Hormone	10
4.1. Bestimmung des an die Membran gebundenen (¹²⁵ J)-Insulins	10 - 11
4.2. Bestimmung des an die Membran gebundenen (¹²⁵ J)- Glukagons	11
4.3. Bestimmung der Plasma- glukonspiegel (IRG)	11
4.4. Bestimmung des Plasma- insulinspiegels	11
5. Adenylatzyklasetest	12
5.1. Meßprinzip des Adenylatzy- klasetests	12 - 14
5.2. Herstellung der(³² P) ATP Lösung	14 - 15
5.3. Bestimmung der Adenylatzy- klaseaktivität	15 - 16
5.4. Trennung des(³² P)-3':5' - AMP von (³² P) - ATP	17

5.4.1. Trennung über Aluminiumhydroxydsäulen	17
5.4.2. Trennung an Dowex- und Aluminiumhydroxydsäulen	17
5.4.3. Präparation des Dowex-Harzes	18
5.4.4. Präparation der Säulen	
5.4.5. Elution des Reaktionsgemisches	18 - 19
5.4.6. Berechnung der Aktivität der Adenylatzyklase	19 - 21

III. Ergebnisse

1.1. Ermittlung der Inkubationsbedingungen (Hormonstimulation der Adenylatzyklase mit Glukagon)	22 - 23
1.2. Einfluß von Methyl-Isobutyl-Xanthin (IBMX) auf die Adenylatzyklaseaktivität	23 - 24
1.3. Anreicherung der Adenylatzyklase während der Präparation der Plasmamembranen	24 - 26
2. Vergleich der Dosiswirkungskurven der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase bei normalen und diabetischen Nagern	26
2.1. Vergleich der Dosiswirkungskurven der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase unter Normalbedingungen (ohne Zusatz von Guanosintriphosphat im Testmedium) bei gesunden und streptozotocindiabetischen Ratten (80 mg/kg)	26 - 27
2.2. Vergleich der Dosiswirkungskurven der Adenylatzyklase aus Plasmamembranen von normalen und diabetischen Chinesischen Streifenhamstern	27
2.2.1. Glukagonstimulierbarkeit der Adenylatzyklase ohne GTP im Inkubationsmedium	27

2.2.2.	Dosiswirkungskurve der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase bei Chine- sischen Streifenhamstern mit GTP (guanosintriphosphat) im Inkubationsmedium	28
2.3.	Streptozotocindiabetes bei der Ratte (100 mg/kg)	
2.3.1.	Dosiswirkungskurve der Glukagonstimula- tion der Adenylatzyklase ohne GTP im In- kubationsmedium	28
2.3.2.	Vergleich zwischen der Bindung von Glukagon an die Plasmamembranen aus Lebern diabetischer (100 mg/kg Strep- tozotocin) und normaler Ratten	30 - 31
2.3.3.	Glukagonstimulierbarkeit bei Diabetes mit Ketonurie	31
2.4.	Einfluß von Guanosintri- phosphat (GTP) auf die Dosis- wirkungskurven der Glukagon- stimulation der Adenylatzyk- lase bei normalen und diabetischen Ratten (100 mg/kg Streptozotocin)	31 - 33
3.	Die Glukatonstimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems diabetischer Ratten (100 mg/kg Streptozotocin) nach Behandlung mit Insulin	33 - 34

IV. Diskussion

1.	Hepatische 3':5'-AMP Spiegel bei verschiedenen Stoffwechsel- situationen	35 - 37
2.	Die hormonelle Regulation der 3':5'-AMP Spiegel (PDE Adeny- latzyklase)	37 - 39
3.	Unterschiedliche Hormonstimu- lierbarkeiten des Adenylatzy- klasesystems in verschiedenen Stoffwechselsituationen - Rolle des GTP bei der Signal- übertragung	39 - 46
4.	Die Bedeutung von Glukagon und Insulin auf die Pathogenese des Diabetes und die Regulation des Adenylatzyklasesystems	47 - 50

V. Zusammenfassung	51 - 52
--------------------	---------

VI. Literaturverzeichnis	53 - 67
--------------------------	---------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
5'-AMP	Adenosin -5'- monophosphat
3':5'-AMP	3':5'- Adenosinmonophosphat (zyklisch)= cAMP
ATP	Adenosintriphosphat
CP	Creatinphosphat
CPK	Creatinphosphokinase
GDP	Guanosindiphosphat
G-pp-(NH)-p	Guanosin 5' (β, γ) imino- triphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
PP _i	anorg. Pyrophosphat
PDE	3':5'-AMP - Phosphodiesterase
S.E.M.	Standard error of Mean. (mittl. Fehler)
SD	Standardabweichung
TRIS	Tris (hydroxylmethyl) aminomethan

I. EINLEITUNG

Mit der Entdeckung des zyklischen 3':5'-AMP als "second messenger" bei der Übertragung eines Hormonsignals auf den Zellstoffwechsel durch Sutherland und Mitarbeiter (Sutherland und Rall (77), Sutherland et al. (80)) wurde ein wichtiger Schritt zum Verständnis verschiedener Hormonwirkungen auf molekularer Ebene getan.

Eine ganze Reihe von Stoffwechselprozessen in Geweben und Organen erwies sich als abhängig vom 3':5'-AMP-Spiegel in den betreffenden Zellen, der seinerseits wiederum von Hormonen reguliert wird. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß eine enge Beziehung zwischen lipolytischen Hormonen und dem intrazellulären 3':5'-AMP-Spiegel in der Fettzelle einerseits und der Lipolyse andererseits besteht (Butcher et al. (15, 16)). Adrenalin erhöhte den 3':5'-AMP-Spiegel in isolierten Fettzellen. Bei Perfusion von Rattenlebern mit Glukagon fanden Exton et al. (22) eine Erhöhung des 3':5'-AMP-Spiegels im Lebergewebe, die von der Dosis des Glukagons im Perfusionsmedium abhängig war. Die Glukose-freisetzung dieser mit Glukagon perfundierten Lebern hing von der Infusionsrate des Hormons ab. Die Autoren schlossen daraus, daß die Glykogenolyse bzw. die Glukoneogenese über eine durch Glukagon verursachte Änderung des intrazellulären 3':5'-AMP-Spiegels reguliert wird. Weitere Befunde sprechen ebenfalls für diese Vorstellungen:

1. Die Effekte des Glukagons können durch Zugabe von 3':5'-AMP (Exton et al. 21) oder durch ein 3':5' AMP-Analoges, wie Dibutyryl 3':5'-AMP (Menahan und Wieland, 53) zum Perfusionsmedium erzielt werden.
2. In isolierten Leberzellen steigen die 3':5'-AMP-Spiegel bei Zugabe steigender Glukagonmengen im Inkubationsmedium dosisabhängig an. (Garrison und Haynes 26, Moxley und Allen 55).

Verschiedene Stoffwechselsituationen, wie Hunger oder Diabetes können die Zellfunktionen über eine Veränderung der 3':5' AMP-Spiegel und (oder) der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Hormonen beeinflussen. Exton et al. (21) fanden in Rattenlebern, die im Hunger den Tieren entnommen wurden, nach Perfusion mit Glukagon eine beträchtliche Erhöhung der 3':5'-AMP-Spiegel. Der 3':5'-AMP-Spiegel war gegenüber den gefütterten Kontrolltieren bei gleicher Glukagonkonzentration um fast das Doppelte angestiegen. Ähnliche Resultate erhielten Selawry et al. (72) an Ratten im Hunger. Sie bezogen die beobachteten 3':5'-AMP-Spiegel nicht auf das Lebergewicht, sondern auf die DNS. Lavin et al. (45) fanden auch bei Mäusen im Hunger eine Erhöhung des 3':5'-AMP-Spiegels gegenüber der Norm.

Auch beim Diabetes mellitus werden Veränderungen der 3':5'-AMP-Spiegel sowie der Ansprechbarkeit gegenüber Hormonen beobachtet. Über erhöhte 3':5'-AMP-Spiegel in der Leber bei durch Alloxan oder Insulinantikörper erzeugtem Diabetes berichteten Jefferson et al. (39). Goldberg et al. (28) beschrieben ebenfalls eine Erhöhung von 3':5'-AMP bei Alloxandiabetes. Nach Streptozotocingabe erhöhte sich der 3':5'-AMP-Spiegel in der Leber von Ratten ebenfalls. (Pilkis et al. 61 a, b).

Angeichts der erhöhten 3':5'-AMP-Spiegel in der Leber hungernder oder diabetischer Tiere stellte sich die Frage nach der möglichen Regulation des intrahepatischen 3':5'-AMP-Spiegels bei normaler und pathologischer Stoffwechselsituation, vor allem beim Diabetes mellitus.

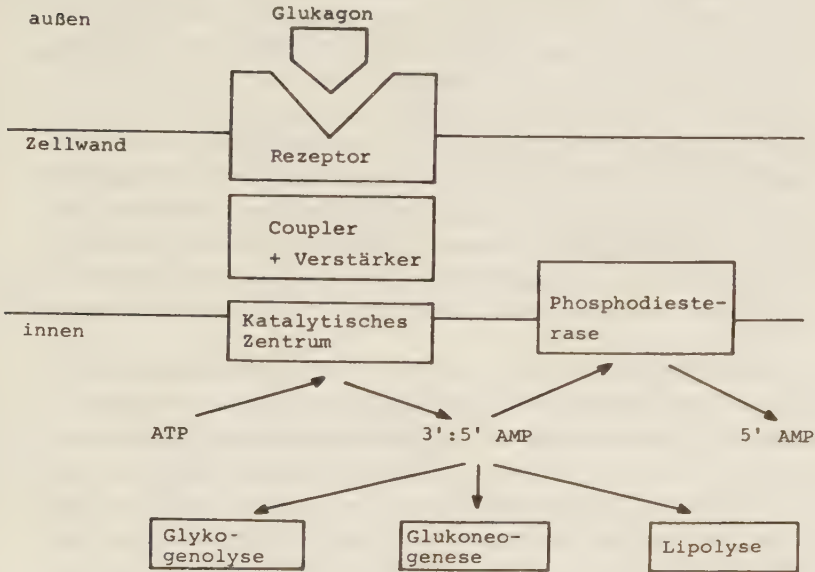
In der Leber sind es insbesondere das Glukagon und die Katecholamine, die den Spiegel von 3':5' AMP über ihre Wirkung auf das Adenylatzklasesystem regulieren.

(Bitensky et al. 12, Marinetti et al. 52, Pohl et al. 63).

An Hand des folgenden Schemas seien die heutigen Vorstellungen

über die Regulation der intrazellulären 3':5'-AMP Konzentration näher erläutert:

(Abb. 1 modifiziert nach Freychet 24 und Hepp et al. 34)



Der erste Schritt ist die Bindung eines Hormones, z.B. des Glukagons an die Leberzellmembran. Über verschiedene, noch zum Teil unbekannte Zwischenschritte (im Schema als "Coupler" bezeichnet) und Verstärker läuft das Hormonsignal zum ebenfalls membranständigen katalytischen Zentrum des Adenylatzyklesystems (Pohl et al. 63): Eine Übersicht über die zur Zeit bestehenden Hypothesen der Signalübertragung findet sich bei Helmreich (36); zur Rolle der Guanylnukleotide: Rodbell und Londos (68). Die Hormonwirkung äußert sich in einer Stimulation der Adenylatzykase, die ATP in 3':5'-AMP und PP_i umsetzt, gegenüber einer Basalaktivität, die auch vorhanden ist, wenn kein Hormon zugegen ist. (Pohl et al. 63) - Das katalytische Zentrum dieses Enzymsystems kann in Abwesenheit von Glukagon oder anderen Hormonen mit Natriumfluorid stimuliert werden, wobei bei dieser Stimulation keine intakte Membranstruktur mehr vorhanden sein muß.

Inkubation von Plasmamembranen aus Lebern, die noch das vollständige Repertoire zur Glukagonstimulation der Adenylatzyklase besitzen, mit Phospholipase A oder Digitonin führt zu einem fast vollständigen Verlust der Glukagonstimulation, nicht aber zu einer Erniedrigung des Effektes von NaF. (Birnbaumer et al. 8).

Das durch die Hormon- bzw. Glukagonstimulation vermehrt gebildete 3':5'-AMP in der Leber kann nun seinerseits in verschiedene Stoffwechselabläufe eingreifen und wirkt dort entweder fördernd oder hemmend: Stimulation der Glukoneogenese und des Glykogenabbaues (Sutherland et al. 80) bzw. Hemmung der Glykogenbiosynthese (Bishop und Larnier, 10).

Der 3':5'-AMP Gehalt kann aber nicht nur durch eine Veränderung des Adenylatzyklasesystems, sondern auch durch die Phosphodiesterase (PDE) gesteuert werden. (Loten und Sneyd, 49, Tria et al. 83). Dieses Enzym baut 3':5'-AMP in 5'-AMP ab und vermindert somit den Gehalt an 3':5'-AMP in einer Zelle. Andererseits kann eine Hemmung der PDE mit bestimmten Inhibitoren, wie Isobutylmethylxanthin (IBMX) den intrazellulären 3':5'-AMP Spiegel erhöhen. So zeigten Moxley et al. (55) an isolierten Hepatozyten eine Verdoppelung der 3':5'-AMP Spiegel nach Glukagonstimulation in Gegenwart von PDE Hemmern (Theophyllin, SQ 20009, Papaverin).

Die Rolle der beiden Enzymsysteme in der Regulation der 3':5'-AMP Spiegel beim Diabetes blieb jedoch kontrovers: Appleman et al. (2) diskutierten vor allem die Rolle der insulinabhängigen Phosphodiesterase. Sind nun die beim Diabetes erhöhten 3':5'-AMP Spiegel in der Leber durch eine veränderte Ansprechbarkeit des Adenylatzyklasesystems auf Glukagon oder durch eine verminderte PDE Aktivität zu erklären?

Pilkis et al. (61 a, b) fanden eine um ca. 20 % erniedrigte PDE Aktivität bei streptozotocinbehandelten Ratten gegenüber den normalen Tieren.

Nach Insulinbehandlung der diabetischen Tiere steigt die PDE aus den Plasmamembranen der Leber dieser Tiere wieder an (um ca. 50 %). Auch Senft et al. (73) stellten bei alloxandiabetischen Ratten eine erniedrigte PDE Aktivität im Leberhomogenat fest. 15 Minuten nach Insulingabe stieg die PDE an. Thompson et al. (81) beschrieben eine durch Insulin aktivierbare PDE in der Plasmamembran der Leber. Tria et al. (83) stellten eine Dosiswirkungsbeziehung zwischen Insulin und der PDE an gereinigten Plasmamembranen fest. Dabei war von den beiden vorhandenen Phosphodiesterasesystemen (hohe bzw. niedrige Substrataffinität) das mit der höheren wesentlich insulinempfindlicher.

Demgegenüber fand Hepp (33) an einer groben Partikelfraktion von Mäuselebern im Streptozotocindiabetes eine ca. 1,5 - 2-fache Erhöhung der Glukagonempfindlichkeit des Adenylatzyklessystems^{ge} gegenüber der Kontrolle. Die basale und mit NaF stimulierte Aktivität bleiben jedoch im wesentlichen unverändert. Eine Behandlung mit Insulin in vivo führte wiederum zu einem Angleichen der Werte an die Kontrollgruppe. Die Versuchsanordnung schloß einen indirekten Effekt über das PDE System aus. Im Gegensatz dazu standen Befunde von Pilkis et al. (61 b), der keine Erhöhung der Glukagonsensitivität an Lebermembranen diabetischer Ratten nachweisen konnte. Zapf et al. (93) fanden wiederum am Fettgewebe eine erhöhte Katecholaminempfindlichkeit bei streptozotocindiabetischen Ratten: Bei gleicher AdrenalinKonzentration wurden im diabetischen Fettgewebe mehr FFA und Glyzerin freigesetzt als bei den normalen Tieren. Dagegen war die Empfindlichkeit für Glukagon und ACTH erniedrigt. Ausgehend von diesen Befunden war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit:

1. Den Einfluß des Streptozotocindiabetes auf die Glukagonstimulation der Adenylatzyklase an Hand von Dosiswirkungskurven zu untersuchen. Für die Messung der Adenylatzyklaseaktivität sollte dabei ein hoch gereinigtes Plasmamembransystem zur Verfügung stehen, ein Einfluß der Phosphodiesterase-Aktivität unter diesen Bedingungen auszuschließen sein.
2. Den Effekt einer Insulinbehandlung der diabetischen Ratten auf den Verlauf der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase darzustellen.
3. Die Rolle des Guanosintriphosphat (GTP) in der Vermittlung des Glukagonsignals auf die Adenylatzyklase unter normalen und diabetischen Stoffwechselbedingungen zu untersuchen.

II. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Erzeugung und Behandlung des experimentellen Diabetes an Ratten.

Wegen der guten Steuerbarkeit ist Streptozotocin zur Erzeugung eines experimentellen Diabetes besonders geeignet (Gerritsen et al. 27, Frerichs und Creutzfeldt 25). Die Schwere des Diabetes ist in etwa von der Streptozotocindosis abhängig. Schein und Alberti (69) fanden bei der Ratte eine dosisabhängige Steigerung der Blutglukose, der Plasmamatrixglyzeride, der Ketonkörper und einer Reihe anderer Substrate.

1.1. Auswahl der Tiere

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden Wistar-Ratten (Fa. Ivanovas Kisslegg, Allgäu) und in einigen zusätzlichen Experimenten auch Chinesische Streifenhamster (*Cricetulus griseus*, Thomae Biberach) verwendet. Das Gewicht der Ratten, die für die Plasmamembranpräparation in Frage kamen, betrug ca. 120 - 180 g. Es wurden nur männliche Tiere verwendet. Das Körpergewicht der Hamster lag zwischen 25 und 35 g. Die Tiere wurden bis zum Tage der Präparation zu jeweils 2 - 5 in einem Käfig gehalten und mit dem üblichen Trockenfutter (Fa. Altromin GmbH. Lage, Lippe) sowie Trinkwasser ad libitum versorgt. Zwölf Stunden vor der Präparation wurde den Tieren das Futter entzogen, nicht jedoch das Wasser.

1.2. Erzeugung des Diabetes

Einer Gruppe von ca. 5 Tieren wurde eine einmalige Dosis von Streptozotocin in die mit heißem Wasser hyperämisierte Schwanzvene injiziert. Die Dosis betrug je nach Fragestellung 80 bzw. 100 mg/Kg Körper-

gewicht. (Der Kontrollgruppe wurde ein gleiches Volumen physiologischer Kochsalzlösung injiziert). Die Streptozotocinlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 80 bzw. 100 mg wurden abgewogen und in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung, deren pH mit einem Tropfen konzentrierter Essigsäure auf 4 eingestellt wurde, gelöst. Die Konzentration betrug 80 bzw. 100 mg/ml. Den Tieren wurde ein ihrem Gewicht entsprechendes Volumen dieser Lösung gespritzt.

Der Verlauf des Diabetes wurde durch Testung des Urins auf Glukose und Ketonkörper kontrolliert. (Clinist^{ix} bzw. Ketostix, Fa. Ames). Bei einer Dosis von 100 mg/kg hatte etwa die Hälfte der Tiere Ketonkörper im Urin, außerdem war klinisch immer eine starke Exsikkose sowie Polyurie und Verlust der Fettpolster festzustellen. Bei dieser Dosis starben ca. 30 % der Tiere. Nach 3 bzw. 6 tägiger Dauer wurden die Tiere dekapitiert, die Lebern entnommen und die Plasmamembranen präpariert. Allen Tieren wurde 12 Stunden vor ihrer Tötung das Futter entzogen.

1.3. Behandlung des Diabetes mit Insulin

Nach einer drei- bis sechstägigen Dauer des Diabetes wurde einer Gruppe von Tieren Insulin s.c. gespritzt. Die Behandlung erfolgte zweimal täglich mit einem Depot-Insulin (Insulin CR Hoechst). Die Dosen betrugen 8 E morgens (8 Uhr) und 10 E abends (20 Uhr). Nach ca. 24 Stunden waren meist alle Tiere harnzuckerfrei. Ratten, die nach dieser Zeit noch Glukose im Urin hatten, bekamen jeweils zusätzlich eine Einheit Insulin subkutan gespritzt. Am Tag vor der Membranpräparation wurde die letzte Insulindosis vormittags gegeben und um 18 Uhr den Tieren das Futter entzogen. Eine Urinzuckerkontrolle eine Stunde vor der Präparation ergab fast immer negativen Urinzucker.

Tiere, die wieder Zucker im Urin aufwiesen, wurden nicht für die Präparation verwendet.

2. Präparation der Leberplasmamembranen (Bachmann et al. 3).

Die Präparation der Plasmamembranen erfolgte nach einer Modifikation der Methoden von Neville (57), Emmelot et al. (18) und Ray (66). Eine nähere Beschreibung findet sich bei Bachmann et al. (3). Für jede Membranpräparation wurden 4 Ratten benötigt, die wie in Abschnitt 1 beschrieben, entweder normal, diabetisch, oder diabetisch und anschließend mit Insulin behandelt waren. Bevor die Lebern der Tiere exzidiert wurden, wurden sie in situ unter Äthernarkose solange mit eiskalter phys.Kochsalzlösung perfundiert, bis die perfundierte Flüssigkeit blutfrei war. Die Abtrennung des Leberparenchyms vom Bindegewebe erfolgte mit einer Siebpresse (Durchmesser der Löcher 0.8 mm). Im Dounce-Homogenisator wurden die Lebern dann in einem Medium aus 1 mM NaHCO_3 und 0,5 mM CaCl_2 (W:V 1:10) homogenisiert. Nach diesem Schritt wurde das Homogenat 20 Minuten lang bei 1000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand in der Hälfte des ursprünglichen Volumens resuspendiert und bei 1500 xg 15 Minuten lang abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Das schließlich vorhandene Pellet wurde in einer Sucroselösung suspendiert, wobei der resultierende Brechungsindex des Sucrose-Leberhomogenat-Gemisches auf $d = 1,19$ eingestellt wurde. Diese Suspension wurde in ein Beckmann SW 27 Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und mit drei weiteren Sucroselösungen abnehmender Dichte überschichtet. ($d_1 = 1,181$, $d_2 = 1,176$, $d_3 = 1,153$). Nach einer zweistündigen Ultrazentrifugation bei 100 000 xg (ca. 27 000 rpm) konnte eine weiße kompakte

Fraktion zwischen den Dichten $d_2 = 1,176$ und $d_3 = 1,153$ gewonnen werden. Diese Fraktion, welche die gereinigten Plasmamembranen enthält, wurde noch zweimal gewaschen (mit Puffer). Alle Präparationsschritte wurden im Kühllabor bei 4° durchgeführt.

3. Markerenzyme und Proteinbestimmung

Zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmamembranen wurden die 5' Nukleotidase (E.C 3.1.3.5., Mitchell und Hawthorne 54), die Mg^{2+} abhängige ATP ase (EC 3.6.1.3., Emmelot und Bos 18), und die alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1, Emmelot und Bos, 18) bestimmt. Die Glukose-6-phosphatdehydrogenase (EC 3.1.3.9. de Duve et al., 20) zeigt mikrosomale Komponenten an, während für die Verunreinigungen der Plasmamembranen mit Mitochondrien die Succinat-2- (p-jodophenyl)-3-p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium-reduktase (Succinat-INT-reduktase EC 1.399.1, Pennington 59), ein guter Gradmesser ist. (Ergebnisse der einzelnen Plasmamembranpräparationen siehe Tabelle 1).

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von Lowry et al. (50) beschriebenen Methode, wobei Rinderserumalbumin als Standard verwendet wurde.

4. Bestimmung der Bindung von Insulin und Glukagon an die Plasmamembran und der Plasmaspiegel beider Hormone.

4.1. Bestimmung des an die Membran gebundenen (^{125}J)-Insulin.

Die Membranen wurden 20 Minuten lang in einem TRIS-Albumin-Puffer (20 mM TRIS, 2,5 g% Albumin, pH 7,4) bei $25^{\circ}C$ inkubiert. Das Endvolumen des Inkubationsgemisches betrug 500 μ l. Die Radioaktivität des eingesetzten (^{125}J)-Insulins betrug ca. 20 000 - 30 000 cpm

Tabelle 1

Charakterisierung der Plasmamembranen durch Markerenzyme

	Kontrolle (n = 10)	Diabetes (n = 11)	Diabetes + Insulin (n = 5)
Ausbeute mg Protein/ g Leber	0,53 $\pm$ 0,15	0,74 $\pm$ 0,29	0,51 $\pm$ 0,18
5' Nukleotida- se μ Mol P/mg/h	78,8 $\pm$ 22,4	50,5 $\pm$ 16,3	53,1 $\pm$ 19,2
Mg ²⁺ ATP ase μ Mol P/mg/h	32,7 $\pm$ 5,3	36,1 $\pm$ 7,4	34,9 $\pm$ 8,3
Succinat-INT- reduktase nMol INT re- duziert/mg/h	0,68 $\pm$ 0,61	0,84 $\pm$ 0,5	1,02 $\pm$ 0,34
Alkalische Phosphatase μ Mol P/mg/h	20,1 $\pm$ 4,4	27,8 $\pm$ 3,6	26,9 $\pm$ 4,6
Glukose-6- phosphatase μ Mol P/mg/h	2,04 $\pm$ 1,17	1,9 $\pm$ 0,87	1,96 $\pm$ 0,87

Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Membranpräparationen wieder, die gemessenen Aktivitäten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen. ($\bar{x} \pm \sigma$)

im Testansatz. Nach Beendigung der Inkubation wurden jeweils 200 μ l aus den Teströhrchen in Silikonröhrchen umpipettiert und auf einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt erfolgte die Trennung des an die Membran gebundenen (^{125}J)-Insulins vom freien, nicht gebundenen (^{125}J)-Insulins. (Kemmler et al. in Vorbereitung). Die abzentrifugierten Silikonröhrchen wurden dann in flüssiger Luft tiefgefroren und in zwei Teile, einen mit dem Überstand und einen mit dem abzentrifugierten Pellet geschnitten. Beide Stücke des Röhrchens wurden getrennt in ein Zählgläschen gegeben und im Szintillationszähler (Mark II) gezählt.

4.2. Bestimmung des an die Membran gebundenen (^{125}J)-Glukagons.

Diese wurde in ähnlicher Weise wie die des (^{125}J)-Insulins bestimmt. Neben den im vorigen Abschnitt beschriebenen Reagentien (20 mM TRIS 2,5 g% Albumin pH 7,4) befand sich noch zusätzlich 1 mM EDTA im Inkubationsgemisch. Die Konzentration des Glukagons betrug etwa 100 pg/ml, die Radioaktivität etwa 20 000 - 30 000 cpm pro Testsatz).

4.3. Bestimmung der Plasmaglukagonspiegel (IRG) .

Der Spiegel des Glukagons im Plasma des Rattenblutes wurde als immunoreaktives Glukagon (IRG) bestimmt (Unger et al. 84). Als Testreagenz diente ein mit Antikörpern gegen Glukagon (30 K) angereichertes Antiserum. (Lavine et. al. 45).

4.4. Bestimmung des Plasmainsulinspiegels

Die Messung des Insulinspiegels im Plasma der Tiere ebenfalls als immunoreaktives Insulin (IRI) nach der

von Hales und Randle beschriebenen Methode (30).

5. Adenylatzyklastest

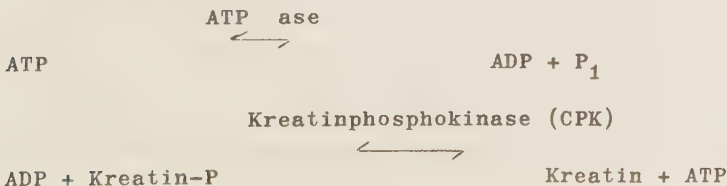
5.1. Meßprinzip des Adenylatzyklastests

Die hormonabhängige, an der Innenseite der Plasmamembran der Leberzelle lokalisierte Adenylatzyklastase (Pohl et al. 63, EC 4.6.1.1. ATP-pyrophosphat-lyase, zyklisierend) stellt ein komplexes System dar. Es katalysiert die Reaktion: $\text{ATP} = 3':5'\text{-AMP} + \text{PP}_i$. Zur Messung der Enzymaktivität wurde in Stellung mit (^{32}P) markiertes ATP verwendet und das bei der Enzymreaktion pro Zeiteinheit entstandene (^{32}P) 3':5' AMP gemessen. Die Aktivität der Adenylatzyklastase wurde in $\text{nMol } (^{32}\text{P}) \text{ 3':5'-AMP g Membranprotein}^{-1} \times \text{Minute}^{-1}$ angegeben.

Da bei fast allen Plasmamembranen relativ viel ATPase Aktivität (Ray et al. 66, Toda et al. 82, Bachmann et al. 3 Tabelle 1) und Phosphodiesteraseaktivität (Tabelle 1, Ray et al. 66, Uria et al. 82) vorhanden ist, muß während der Inkubation dafür gesorgt werden, daß

1. das Substrat ATP nicht durch die ATP-asen vorzeitig zu $\text{ADP} + \text{P}_i$ abgebaut wird und damit der Adenylatzyklastereaktion entzogen wird,
2. das gebildete (^{32}P) 3':5'-AMP durch die Phosphodiesterase nicht weiter zu 5'-AMP umgesetzt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein ATP - Regenerationssystem verwendet, das nach folgendem Prinzip arbeitet:



(Pohl et al. 63, Hepp 33)

Die Hemmung der PDE Aktivität erfolgte entweder mit Xanthinderivaten, wie Isobutylmethylxanthin (IBMX) (Johnson et al. 41, Pilkis et al. 61 b, Moxley et al. 55) oder durch ein sogenanntes Trapping System" (Bär und Hechter, 4): Im Testansatz wurde ein hoher Überschuß an unmarkiertem 3':5' AMP vorgelegt, so daß das durch die Enzymreaktion entstandene (^{32}P) 3':5' AMP im kalten 3':5' AMP so stark verdünnt war, daß von der PDE fast nur noch das unmarkierte abgebaut wurde. (Birnbauer et al. 7, Bitensky et al. 12, Hepp et al. 31).

In der vorliegenden Arbeit wurde fast ausschließlich dieses Trapping System eingesetzt. Wie folgende Berechnung aus den Versuchsbedingungen zeigen, war der Abbau des neu gebildeten 3':5' AMP bei einer Gesamtkonzentration von 100 nMol/Testansatz zu vernachlässigen:

3':5' AMP Menge im Test	:	100 nMol / 100 μl
Aktivität der Phosphodiesterase (berechnet nach den Angaben von Pilkis et al. 61 b)	:	40 pMol / 10 Min

Die bei Pilkis et al. (61 b) angegebene PDE Aktivität von 1,6 nMol/mg Membranprotein / 30 min entsprechen unter unseren Versuchsbedingungen (10 Minuten Inkubation, ca. 70 - 100 μg Membranprotein pro Testansatz) einem Abbau von 40 pMol 3':5' AMP durch die Phosphodiesterase. Die Menge des im Testansatz neu gebildeten (^{32}P) 3':5'- AMP beträgt am Ende der Inkubation bei einer Adenylatzyklaseaktivität von ca. 400 nMol/g Membranprotein x Minute (s. Abschnitt Ergebnisse) und einer Membranmenge pro Testansatz von ca. 70 -100 μg :

$$\frac{400 \times 10 \times 70}{10^6} = 0,28 \text{ nMol } (^{32}\text{P}) \text{ 3':5' AMP}$$

Daraus ergibt sich als Verhältnis von markiertem zum vorgelegten, nicht markierten 3':5'-AMP 0,28:100 = 1:360. Bei dieser Verdünnung von 1:360 beträgt der Abbau des neu gebildeten (^{32}P) 3':5'-AMP während der Inkubation durch die Phosphodiesterase (s.S. 13):

0,04 nMol : 360 = 0,1 pMol, d.h. der Abbau des (^{32}P) 3':5' AMP durch die Phosphodiesterase kann gegenüber den 0,28 nMol, die durch die Enzymreaktion entstanden sind, vernachlässigt werden:

5.2. Herstellung der (^{32}P) ATP Lösung

Das von der Fa. Amersham (England) hergestellte (α ^{32}P) ATP ist in 1 ml eines Äthanol-Wassergemisches (V:V = 1:1) gelöst, hat eine Gesamtradioaktivität von 1 mCi und eine durchschnittliche spezifische Radioaktivität von ca. 8 - 10 Ci /mMol. Für eine Versuchsreihe wurden jeweils 100 μ l aus dem Bleigefäß in ein 1,5 ml fassendes Reagenzgefäß (Fa. Eppendorf) unter größter Vorsicht pipettiert. Dieses Volumen, dessen Gesamtradioaktivität 0,1 mCi betrug, wurde unter einem feinen Luftstrom mit einer Pasteurpipette getrocknet. Das zurückbleibende (^{32}P) ATP wurde anschließend in 1 ml ATP Lösung (4,5 mM, pH 7,0, mit NaOH eingestellt) aufgenommen. Die Menge des radioaktiven (α ^{32}P) ATP kann gegenüber der des nicht markierten ATP vernachlässigt werden: Da 0,1 mCi bei einer spezifischen Radioaktivität von ca. 10 Ci/mMol etwa 10 nMol (^{32}P) ATP enthalten, beträgt die Konzentration des radioaktiven (^{32}P) ATP in 1 ml Volumen kalten ATP 0,01 mM. Diese Konzentration kann gegenüber

der Gesamtkonzentration von 4,5 mM vernachlässigt werden. Für den Test wurden 10 μ l dieser Lösung mit ca. 300 000 - 600 000 cpm eingesetzt.

5.3. Bestimmung der Adenylatzyklaseaktivität

Zur Bestimmung der dosisabhängigen Glukagonstimulierbarkeit wurden die frisch präparierten Lebermembranen der Kontrollgruppe, der diabetischen und der mit Insulin behandelten Tiere in den Test eingesetzt. Neben steigender Glukagonkonzentration (0,05, 0,1, 0,5, 1,0 5,0, 10 μ g/ml Testkonzentration) wurden bei jeder Inkubation auch die Basalwerte und die mit NaF (10 mM) stimulierte Aktivität gemessen. Um die entsprechende Glukagonkonzentration zu erhalten, wurde von einer Glukagonstammlösung (1 mg Glukagon in ein Volumen von 1 ml 0,02 N HCl) eine Verdünnungsreihe entsprechend den obengenannten Konzentrationen mit Aqua bidest. hergestellt.

Die Inkubation erfolgte im einzelnen nach folgendem Schema: (Tabelle 2)

Basalwerte	Glukagonstimulation	NaF-Stimulation
ohne Glukagon	mit verschiedenen	
ohne NaF	Glukagonkonzentrationen	

Jede Bestimmung der Basal-, Glukagon-, und NaF-Werte erfolgte in Doppel- bzw. in Dreifachwerten. Das Endvolumen im Teströhrchen (Fa. Eppendorf) betrug 100 μ l. Die einzelnen Reagenzien wurden entsprechend der im Schema der Tabelle 2 angegebenen Reihenfolge in das Eppendorfeup pipettiert. Das Kreatinphosphat wurde erst kurz vor jeder Inkubation in 1 ml Puffer (TRIS/HCl 20 mM pH 7.4) aufgelöst.

Tabelle 2

Reihenfolge der Pipettierung der für den Adenylatzyklase
test notwendigen Reagenzien

Reagenz	Herkunft	Ausgangskon- zentration(mM)	Aliquot	Testkon- zentra- tion(mM)
TRIS/HCl	Merck, Darm- stadt, p.a.	200, pH 7,4	10	20
MgCl ₂ ·6H ₂ O	dto.	50	10	5
3',5'AMP	Boehringer p.a.	10 pH 7,5	10	1
Albumin	Schweizer Rotes Kreuz	1%	10	0,1%
Glukagon	Novo Research Laboratories Denmark	0,5 - 50µg/ml	10	0,05- 5µg/ml
NaF	Merck p.a.	100	10	10
EDTA	dto.	10 pH 7,4	10	1
GTP(Trili- thiumsalz)	Boehringer	1	10	0,1
Kreatinphosphat	dto.	100	10	10
Kreatinphospho- kinase	dto.	3mg/ml	10	0,3mg/ml
(³² P)ATP	Amersham England	4,5	10	0,45
Membranen		70 - 100 µg/ 10 µl	10	70 -100 µg/100µl

Danach wurde das gesamte Volumen (1ml) dieser Lösung in ein weiteres Teströhrchen gegeben, in das zuvor 3 mg Kreatinphosphokinase abgewogen worden waren. Von diesem aus Kreatinphosphat (CP) und Kreatinkinase (CPK) bestehende Gemisch wurden dann 10 μ L in den Test eingesetzt. Die geschweifte Klammer in dem Schema der Tabelle 2 soll dies zum Ausdruck bringen.

Die Adenylatzklasereaktion wurde durch Zugabe der Membranen zu den einzelnen Teströhrchen, welche die in der aufgeführten Weise nötigen Reagenzien enthielten gestartet: Zu jedem Testcup, beginnend mit dem ersten (Basalwerte), in Abständen von jeweils 30 Sekunden für das folgende Teströhrchen, wurden 10 μ L der frisch präparierten und homogenisierten Membransuspension gegeben. Das Reaktinsgemisch wurde bei 37°C dann 10 Min. lang inkubiert. Die Beendigung der Reaktion erfolgte nach Ablauf der 10 Minuten durch Zugabe von 100 μ L einer sogenannten Stoplösung in jedes Teströhrchen. Diese "Stoplösung" wurde folgendermaßen hergestellt: 0,2 g Na-Dodecylsulfat, 242,3 mg ATP und 1,4 ml 3':5'-AMP (10 mM) wurden in einem Volumen von 10 ml gelöst und auf pH 7.5 eingestellt. Nach zupipettieren dieser Stoplösung wurde sofort jedes Teströhrchen 3 Minuten bei 97°C ins heiße Wasserbad gestellt und anschließend im Eisbad gekühlt.

5.4. Trennung des (32 P)-3':5' AMP von (32 P)-ATP

Da das Reaktionsgemisch nach Ablauf der Adenylatzklasereaktion neben dem neu entstandenen (32 P) 3':5' AMP noch einen außerordentlich hohen Überschuß an nicht umgesetztem (32 P)-ATP enthält (es entstehen nur etwas 0,05 % (32 P)-3':5'-AMP gegenüber dem (32 P)-ATP, Salomon et al. 70 a) muß eine sehr empfindliche Trennungsmethode angewendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden geprüft:

5.4.1. Trennung über Aluminiumhydroxydsäulen

Dazu wurde das nach obigen Bedingungen inkubierte Reaktionsgemisch noch mit 20 μ l (^3H) 3':5'-AMP zur Berechnung der Wiederfindung von 3':5'-AMP an der einzelnen Säule und mit 400 μ l Aqua bidest. versetzt. Dieses Volumen wurde auf Säulen gegeben, die mit je 2 g Al_2O_3 gefüllt und mit TRIS/HCl (40mM, pH 7.6.) äquilibriert waren. Die sich anschließende Elution mit TRIS/HCl (40 mM, pH 7.6.) erfolgte in zwei Schritten:

- a) 2,1 ml TRIS werden auf die Säule pipettiert, das Eluat wird verworfen
- b) 3,0 ml TRIS wurden anschließend auf die Säule gegeben, das Eluat wurden in einem PACKARD Gefäß gesammelt, da in dieser Fraktion das gebildete (^{32}P) 3':5'-AMP enthalten war. Zur Zählung im Scintillationszähler (Mark II Liquid Scintillation System, Saarle Comp., USA) wurden in das Packardgefäßchen noch 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Scintigel, Fa. Roth KG, Karlsruhe) gegeben. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Leerwerte bei dieser Methode relativ hoch lagen: ca. 400 - 500 cpm. Die Wiederfindung betrug bei dieser Methode bezogen auf (^3H) 3':5'-AMP etwa 75 - 80 %.

5.4.2. Trennung mit Dowex- und Aluminiumhydroxydsäulen (Salomon et al. 70 a).

Da die Leerwerte bei Trennung auf Aluminiumhydroxyd mit ca. 400 cpm noch zu hoch lagen und damit die Empfindlichkeit relativ zu gering war (Salomon et. al. 70a), wurde in vorliegender Arbeit eine andere, empfindlichere Trennmethode gewählt. Die Trennung erfolgte hierbei zuerst über Dowex- und dann in einem weiteren Schritt über Aluminiumhydroxydsäulen.

5.4.3. Präparation des Dowex-Harzes

Dowex (Wx 4, mesh 200 - 400, Gegenion H^+) oder W x 2 wurden im Becherglas mit 1 N HCl (W/V = 1:1) gerührt. Nach Sedimentation des Dowex wurde die Salzsäure verworfen und durch ein gleiches Volumen Wasser ersetzt. Nach erneutem Rühren und Verwerfen des wässrigen Überstandes, wurde diese Prozedur solange wiederholt, bis im Überstand ein pH von 3 - 4 erreicht wurde. Dieses Dowex-Wassergemisch konnte über Monate benutzt werden.

5.4.4. Präparation der Säulen

Auf jede mit einem Schaumstoffplättchen unten abgedichtete Säule wurde mit einer 1 ml-Eppendorfpipette ein Milliliter der oben beschriebenen Dowex-Wassersuspension gegeben, außerdem noch zusätzlich ein Milliliter Wasser. War die überstehende Flüssigkeit durchgelaufen, konnte die Säule für die Trennung benutzt werden. Ein Trockenlaufen der Säulen mußte vermieden werden. Für jeden Versuch wurden die Säulen neu vorbereitet. Die Aluminiumhydroxydsäulen wurden auf folgende Weise hergestellt: In jede mit einem Schaumstoffplättchen abgedichtete Säule wurden 0,6 g Al_2O_3 gegeben. Vor dem Versuch wurden die Säulen mit 8 ml Imidazolpuffer (0,1 M, pH 7,5) äquilibriert. Im Gegensatz zu den Dowexsäulen konnte diese öfters benutzt werden.

5.4.5 Elution des Reaktionsgemisches

Das Gemisch der einzelnen Teströhrchen wurde mit einer 1 ml Eppendorfpipette aus den Teströhrchen auf die Säulen überführt. Sobald dieses Volumen durchgelaufen war, wurden mit 400 μ l Wasser nacheluiert. War auch diese Fraktion durch die Säulen gelaufen, wurde nochmals mit 1 ml Wasser nachgespült. In dieser Fraktion war der Hauptanteil des nicht umgesetzten radioaktiven

(^{32}P)-ATP (Fig.1). Sobald dieses Volumen die Säulen passiert hatte, wurden unter größter Vorsicht die Auffanggefäße für die Eluate gewechselt. Mit weiteren 3 ml Wasser wurde dann das durch die Adenylatzyklase-reaktion gebildete (^{32}P) 3':5'-AMP von den Säulen eluiert. In die Eluatgefäße mit dem (^{32}P) 3':5'-AMP kamen zusätzlich 200 μl Imidazolpuffer (1,5 M; pH 8,3). Der Inhalt wurde anschließend aus den Reagenzröhrchen auf die Aluminiumhydroxydsäulen gegeben. Das hieraus entstehende Eluat wurde in Zählgefäßen (20 ml Fassungsvermögen) gesammelt. War das Volumen durchgelaufen, wurde noch mit 1 ml 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,5) nacheluiert. Zur Zählung im Szintillationszähler wurden die Zählgefäße noch mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. (Szintigel für wässrige Medien der Firma Carl Roth KG, Karlsruhe).

5.4.6. Berechnung der Aktivität der Adenylatzyklase

Die Zählung erfolgte in einem Szintillationszähler (Mark II, Nuclear Chicago), wobei aufgrund der Doppelmarkierung des 3':5'-AMP mit (^{32}P) und (^3H) zur Berechnung der Wiedererfindung (siehe auch Abb. 2), eine optimale Trennung der beiden Zählkanäle (^3H) und (^{32}P) erreicht werden mußte. Dies geschah durch Einstellung eines bestimmten Zählfensters für die beiden Isotope am Szintillationszähler.

Kanal A(^3H) - Kanal)	: lower level: 01
	upper level: 25
	range : B 900
Kanal B(^{32}P)- Kanal)	: lower level: 05
	upper level: 50
	range ; G 455
Kanal A + B	: "man"
Programm	: Local

Der Ausdruck des Gerätes enthielt neben der Zählzeit (10 Minuten) die cpm für (^3H) und (^{32}P), sowie ein

Zahlenverhältnis für den beim Zählvorgang in jeder Probe auftretenden Löscheffekt. (Quench). Aus diesen Daten, der Proteinmenge, die im Test eingesetzt wurde, der Inkubationszeit (10 Minuten) und den cpm eines Standards für (^{32}P) (10 μl (^{32}P)-ATP in 3 ml Wasser und 10 ml Szintigel, Radioaktivität ca. 300 000 - 600 000 cpm / 10 μl) und (^3H) (20 μl (^3H) 3':5' AMP in 3 ml Wasser und 10 ml Szintigel, Radioaktivität ca. 20 000 cpm / 20 μl) wurde dann mit Hilfe eines Magnetkarten-Rechenprogrammes auf einer OLIVETTI Rechenmaschine (Programma 101) die Aktivität der Adenylatzyklase in nMol 3':5' AMP/g Membranprotein / min. berechnet. Das Rechenprogramm beinhaltete insgesamt 65 Rechenschritte, die ausgehend von der Eingabe des (^3H)-Standards des (^{32}P) Standards, des (^{32}P)/ ^3H Kanalverhältnisses (in unseren Versuchen ca. 8 - 10 / 1) noch die Steigung der Quenchkurve und die Zählalbeute für (^3H) und (^{32}P) enthielt. Im Prinzip erfolgte die Berechnung nach folgender Formel:

$$\text{nMol 3':5'-AMP} \times \text{g}^{-1} \times \text{min.}^{-1}$$

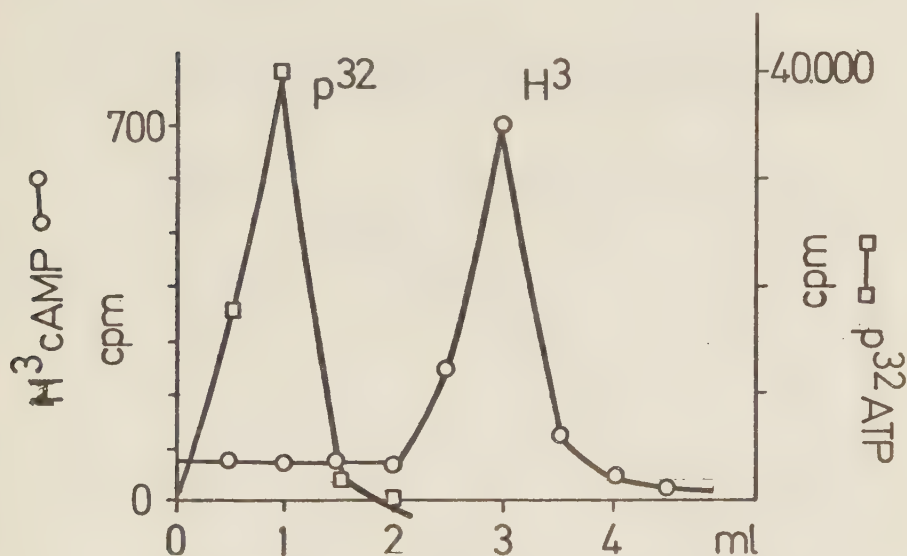
=

$$\frac{\text{Meßwert (dpm)} \times \text{Molarität von ATP}}{\text{Standard (dpm)} \times \text{Minuten} \times \text{Proteinmenge}}$$

$$\text{Standard (dpm)} \times \text{Minuten} \times \text{Proteinmenge}$$

Trennung von cAMP und ATP auf Dowex (WX 4) Säulen

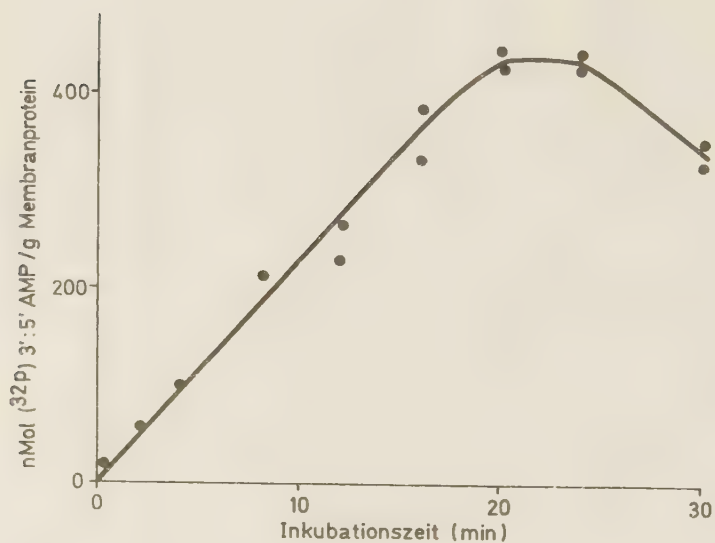
Wiederfindung p^{32} : 90 % - H^3 : 73 %



In ein Eppendorf Teströhrchen wurden alle für die Inkubation der Adenylatzyklase erforderlichen Reagenzien (mit Ausnahme der Membranen) sowie (^{32}P) ATP und ($^3H^0$)-3':5' AMP gegeben und 10 Minuten bei $37^\circ C$ inkubiert. Dann wurde Stopplösung hinzugegeben und der Inhalt Säule mit Dowex W x 4 getrennt. Die Fraktionen wurden in je 0,5 ml Portionen gesammelt, in Packardgefäße gegeben und mit 10 ml Szintigel gefüllt. Die Zählung erfolgte wie im vorigen Kapitel beschrieben. Die Berechnung der Wiederfindung von (^{32}P)-ATP und (H^3)cAMP erfolgte durch Summation der in den einzelnen Fraktionen gefundenen cpm und der cpm eines Standards für (H^3)cAMP bzw. (^{33}P)-ATP. Die Wiederfindung für (^{32}P) betrug über 90 % diejenige für 3H etwa 70 %. Die schlechtere Wiederfindung des H^3 cAMP bei dieser Methode gegenüber der alleinigen Verwendung von Aluminiumhydroxysäulen, finden auch Salomon et al. (70a). Diese wird aber durch die wesentlich höhere Empfindlichkeit (geringer Leerwert) wettgemacht. In Übereinstimmung mit Salomon et al. (70a) finden wir Leerwerte von weniger als 20 cpm.

Abbildung 3

Zeitabhängigkeit der Stimulation des Adenylatzyklesystems
in Gegenwart von $0,1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Glukagon



Die Membranen stammen aus Lebern normaler Ratten. Die Abbildung
gibt die Ergebnisse zweier getrennter Inkubationen wieder.

III. ER G E B N I S S E

1.1. Ermittlung der Inkubationsbedingungen (Hormonstimulation der Adenylatzyklase mit Glukagon)

Fig. 3 zeigt die Zeitabhängigkeit der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase in Plasmamembranen normaler Rattenlebern. Die Stimulation erfolgte ohne Zusatz von Guanosintriphosphat (GTP). In zwei Eppendorf-Teströhrchen wurden jeweils 100 μ l der zur Inkubation notwendigen Reagenzien (s.Tab.1) und 100 μ l Membranen pipettiert, so daß das Endvolumen 1,0 ml betrug. Die beiden identischen Testansätze wurden bei 37°C 10 Minuten inkubiert, zu den in Fig. 3 angegebenen Zeiten wurde jeweils ein Aliquot von 100 μ l entnommen und mit 100 μ l Stopplösung versetzt. Anschließend wurde 3 Minuten bei 97°C gekocht und dann das Reaktionsgemisch auf Eis gelegt. Die Trennung von (32 P) - ATP und (32 P)- 3':5'-AMP erfolgte wie unter 4.4.2 beschrieben. Die Glukagonkonzentration im Test betrug 0,1 μ g/ml, entsprechend einer Menge von ca. $3,5 \times 10^{-8}$ M. Die von Pohl und Birnbaumer (63) Hepp und Renner (32) und Hepp et al. (31) angegebene Inkubationszeit von 10 Minuten war auch für die vorliegenden Versuche ausreichend, da in diesem Zeitbereich noch vollständige Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit herrscht. Die nach ca. 16 Minuten zu beobachtende Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, das sich anschließende Plateau und der dann einsetzende Abfall der Stimulation lassen eine längere Inkubationszeit als nicht ratsam erscheinen. Pohl et al. (63) fanden ebenfalls eine Verlangsamung und ein anschließendes Plateau der Zeitabhängigkeit, das umso früher beginnt, je mehr

Membranen im Test eingesetzt werden. Als mögliche Gründe werden von diesem Autor diskutiert:

1. Aggregation der Membranen
2. Glukagonabbau
3. Produktion eines Inhibitors
4. langsame Erschöpfung des ATP-Regenerations-systems

Die von Rodbell et al. (67) beschriebene, von der eingesetzten Glukagonkonzentration abhängige Zeitverzögerung der Aktivierung des Adenylatzyklase-systems, die im Bereich von 30 - 60 Sekunden nach Inkubationsbeginn lag, war bei den vorliegenden Versuchen nicht zu beobachten, da eine relativ hohe Glukagonkonzentration verwendet wurde. (ca. $3,5 \times 10^{-8}$ Mol/l entsprechend 0,1 μ g/ml). Der von Rodbell beobachtete Effekt ist bei wesentlich niedrigeren Glukagonmengen ausgeprägt und wird mit zunehmender Konzentration kleiner, d.h. die Zeitverzögerung wird immer kürzer. Da unsere erste Zeitmessung erst nach 2 Minuten erfolgte, wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

1.2. Einfluß von Methyl-Isobutyl-Xanthin (IBMX) auf die Adenylatzyklaseaktivität

Um die Frage zu klären, ob IBMX, das ein Hemmer der CAMP-Phosphodiesterase-Aktivität ist, (Johnson et al. 41, Pilgis et al. 61b) zu dem verwendeten "Trapping System" einen zusätzlichen Effekt auf die Bildung von (32 P)- 3':5'-AMP hat, wurden in zwei Versuchen Membranen unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen mit und ohne Zusatz von 1 mM IBMX (Johnson et al. 41) inkubiert. Tabelle 3 zeigt die Versuchsergebnisse: In Gegenwart von 1 mM IBMX trat nur eine geringgradige weitere Steigerung der mit 10 mM

Tabelle 3

Einfluß von Isobutyl-Methyl-Xanthin (IBMX) auf die Adenylatzyklaseaktivität in Gegenwart des "Trapping System" im Inkubationsmedium

ohne IBMX		mit IBMX	
Experiment I	Experiment II	Experiment I	Experiment II
46,0	54,0	65,0	55,0

Die Membranen wurden nach der Methode von Neville (1968) hergestellt. Im Test wurde die rohe Membranfraktion verwendet (crude fraction). Die Stimulation des Adenylatzyklasesystems erfolgte mit 10 mM NaF. Als "Trapping System" diente ein Überschuß an nicht markiertem 3':5'-AMP. Die Konzentration betrug 1 mM, die des IBMX war ebenfalls 1 mM. (Johnson et al. 40, Pilkis et al. 61 b, Johnson et al. 41). Die Enzymaktivität wurde in nMol (^{32}P) 3':5' AMP / g x min ausgedrückt. Der Unterschied zu den später beobachteten, wesentlich höheren Werten der Adenylatzyklase bei NaF-Stimulation liegt wahrscheinlich darin, daß bei diesen Versuchen die rohe Neville Membranfraktion verwendet wurde, in den folgenden jedoch eine hochgereinigte.

Tabelle 4

Vergleich der Anreicherung der Adenylatzyklase während der
Präparation der Plasmamembranen mit Ergebnissen anderer
Autoren

	Homogenat			Plasmamembranen		
Basal	3,4	2,0	8,7	17 (5)	20 (10)	54 (6)
Glu- kagon 5 ug/ ml	24,4	15	27,5	270 (17)	320 (21)	256 (9)
NaF 10 mM	19,4	-	18,9	160 (13)	190 (-)	468 (24)
	Pohl et al. (63)	Pilkis et al. (61 b)	eigene Versuche	Pohl et al. (63)	Pilkis et al. (61 b)	eig. Vers.

Alle Angaben der Adenylatzyklaseaktivitäten sind auf nMol (^{32}P)-3':5'-AMP/g Membranprotein, x Minute umgerechnet. Die Zahlen in Klammern geben die Anreicherung der Aktivität gegenüber dem Leberrohhomogenat an.

NaF stimulierten Aktivität auf, so daß für den Routinetest das "Trapping System" als ausreichend erachtet wurde.

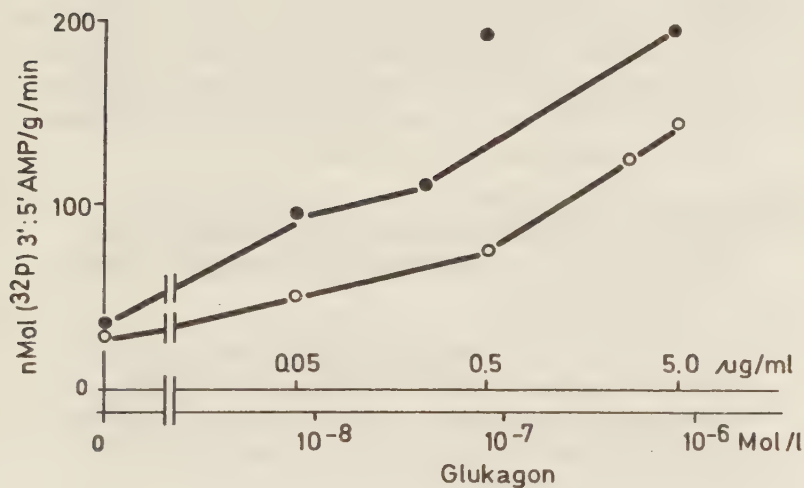
1.3. Anreicherung der Adenylatzyklase während der Präparation der Plasmamembranen

Um die Anreicherung bestimmen zu können, wurde die Aktivität der Adenylatzyklase im Rohhomogenat und in der Plasmamembranfraktion bestimmt. Die Tabelle 4 zeigt die gefundenen Werte und vergleicht sie mit verschiedenen Autoren. Es zeigte sich, daß die Basalaktivität, bzw. die Glukagonstimulation unterschiedlich sind. Die Glukagonstimulation im Rohhomogenat stimmt mit der von Pohl et al. (63) gefundenen überein, nicht jedoch mit der von Pilkis et al. (61b) angegebenen. Die NaF-Stimulation ist mit der von Pohl fast identisch. Leider gibt Pilkis in seiner Tabelle keinen Wert für die NaF-Stimulation im Rohhomogenat an. Die Unterschiede im Rohhomogenat können i) an den verwendeten Tieren, ii) an den Testbedingungen der Adenylatzyklase oder iii) an der Homogenisierungstechnik liegen. Während Pohl und wir etwa den gleichen Adenylatzyklasetest benutzten, verwendete Pilkis (61b) die Präzipitationsmethode mit ZnSO_4 und Na_2SO_4 als Trennung des (^{32}P)-ATP und des neu gebildeten (^{32}P)-3':5'-AMP. Unsere relativ hohen Basalwerte im Rohhomogenat könnten an den verwendeten Tierstämmen oder auch an dem noch an die Lebern gebundenen endogenen Glukagon liegen. Die identischen Fluoridwerte zeigten, daß die Enzymmenge in den Homogenaten gleich ist. Bei der Präparation der Plasmamembranen erhielten wir wiederum einen gegenüber den beiden anderen Autoren erhöhten Basalwert der Adenylatzyklase. Der Einfluß der verschiedenen Präparationstechniken zeigt sich am deut-

lichsten in der proportionalen Zunahme der einzelnen Enzymaktivitäten (Basal, Glukagonstimulations, NaF-Stimulation) gegenüber dem Rohhomogenat. Pohl fand die Basalaktivität etwa 5-fach, das glukagon-stimulierte System um das ca. 17-fache und die Aktivität im Gegenwart von 10 mM NaF um das ca. 13-fache angereichert. Wir fanden die Basalaktivität vergleichbar, die mit NaF stimulierte Aktivität jedoch um das Doppelte (24-fach gegenüber 13-fach), und die mit Glukagon stimulierte Aktivität nur um die Hälfte angereichert. Diese Unterschiede könnten 1) an der unterschiedlichen Präparationstechnik, ii) am unterschiedlichen Tierstamm oder iii) an unterschiedlichen Inkubationsbedingungen der Adenylatzyklase liegen. Da Pohl et al. und wir etwa den gleichen Adenylatzyklasetest verwendeten und auch die mit Fluorid stimulierte Aktivität im Rohhomogenat gleich ist, dürfte der Unterschied an der Präparationstechnik der Plasmamembranen liegen, während die unter ii) und iii) genannten Möglichkeiten weniger wahrscheinlich sind. Die fast doppelt so hohe Anreicherung der mit NaF stimulierten Adenylatzyklaseaktivität in den Plasmamembranen gegenüber denen von Pilkis et al. (61b) und Pohl et al. (63) deutet darauf hin, daß mehr vom katalytischen Zentrum des Enzyms angereichert wurde, da das mit NaF stimulierte System als repräsentativ für das katalytische Zentrum gewertet wird. (Birnbauer et al. 8, Pohl et al. 63). Die im Vergleich geringere Glukagonstimulation ist daher nicht auf geringere Enzymaktivität zurückzuführen, sondern hat wahrscheinlich ihren Grund darin, daß ein Teil der Faktoren, die zur Hormonstimulation führen, während der Präparation der Plasmamembranen verloren geht. Möglicherweise kommt es durch die Präparation auch zu einer Selektion der fluoridstimulierten Adenylatzyklase gegenüber der mit Glukagon stimulierten. Notwendige Faktoren können

Abbildung 4

Dosisabhängigkeit der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase aus Lebern normaler und diabetischer Ratten (80 mg / kg)



Die geschlossenen Kreise geben die Werte der Kontrollen wieder, die offenen die der diabetischen Tiere. Jeder Kurvenpunkt ist der Mittelwert aus zwei getrennten Membranpräparationen.

die Glukagonrezeptoren oder andere Membrankomponenten sein. Pohl et al. (63) berichten, daß bei weiterer Reinigung ihrer Plasmamembranen die durch Glukagon stimulierte Aktivität wieder absank, obwohl die beiden Markerenzyme, die 5' Nukleotidase und die alkalische Phosphatase in ihrer spezifischen Aktivität weiter zunahmen. Ein weiterer Hinweis könnte die Beobachtung von Toda et al (82) sein, die bei weiterer Fraktionierung der Plasmamembranen in eine leichtere und eine schwerere Fraktion eine ungleiche Verteilung der mit Glukagon stimulierbaren Adenylatzyklaseaktivitäten fanden.

2. Vergleich der Dosiswirkungskurven der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase bei normalen und diabetischen Nagern.

2.1. Vergleich der Dosiswirkungskurven der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase unter Normalbedingungen (ohne Zusatz von Guanosintriphosphat im Testmedium) bei gesunden und streptozotocindiabetischen Ratten (80 mg / kg)

Einer Gruppe von 6 Ratten (125 - 160 g/Ratte) wurde Streptozotocin (80 mg / kg) i.v. gespritzt. Die Tiere entwickelten nach 1 - 2 Tagen einen relativ milden Diabetes mit Polyurie, jedoch ohne Ketoazidose oder Zeichen einer Exsikkose. Der Blutzucker betrug 335 ± 21 mg / 100 ml, ($n = 6 \bar{x} \pm$ S.E.M.). Die Empfindlichkeit der verwendeten Tierstämme gegenüber Streptozotocin war in unseren Versuchen meist wesentlich geringer als bei anderen Autoren angegeben. Diese beobachteten bei solchen Dosen bereits eine starke Ketonurie und Ketoazidose, (Rakieten et al. 64, Schein et al. 69, Pilkis et al. 61 b). Die

geringere Empfindlichkeit verschiedener Rattenstämme ist jedoch keineswegs ungewöhnlich, sondern variiert mit der Sensitivität der B-Zellen im Pankreas der einzelnen Tierstämme. (Frerichs und Creutzfeld, 25). Abbildung 4 zeigt die Dosiswirkungskurve von Glukagon bei Plasmamembranen aus Lebern normaler und diabetischer Ratten. Die Glukagonempfindlichkeit ist im Diabetes, der mit 80 mg / kg Streptozotocin erzeugt wurde, gegenüber der Kontrolle herabgesetzt. Dies fanden auch Pilkis et al. (61 b), allerdings benötigten diese Autoren weniger Streptozotocin (65 mg / kg).

2.2. Vergleich der Dosiswirkungskurven der Adenylatzyklase aus Plasmamembranen von normalen und diabetischen Chinesischen Streifenhamstern

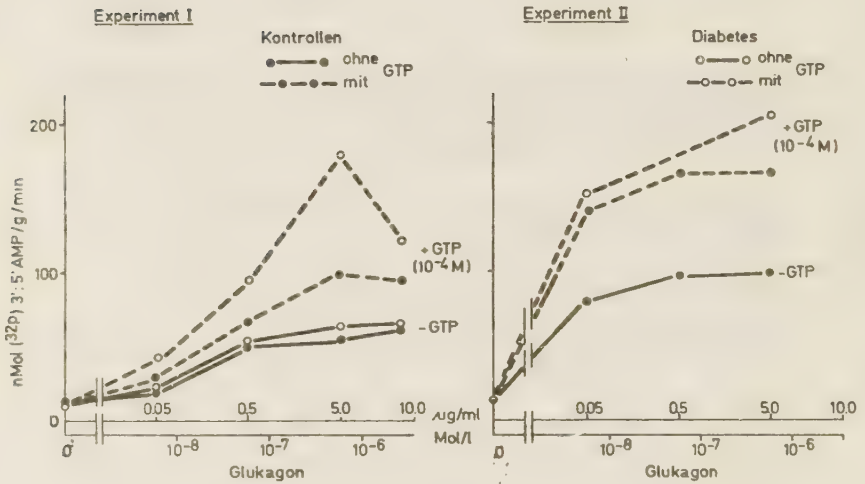
2.2.1. Glukagonstimulierbarkeit der Adenylatzyklase ohne GTP im Inkubationsmedium

Bei einem Inzuchtstamm von Chinesischen Streifenhamstern (s. auch den Abschnitt Material und Methoden) mit einem genetisch fixierten, dominant vererbten Diabetes (Yerganian und Meier 92); Rabinovitch et al. 65) und Blutzuckerwerten von ca. 400 mg % (Rabinovitch et al. 65); Normalwerte ca. bei 100 mg / 100 ml), sowie erniedrigten Plasmainsulinspegeln (um ca. 30 % Rabinovitch et al. 65) wurde die Dosisabhängigkeit der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase gemessen und mit der normaler Tiere verglichen.

Die Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse zweier getrennter Versuche. Der fast identische Kurvenverlauf in Experiment I zeigt, daß auch bei Hamstern, die klinisch einen relativ milden Diabetes ohne Exsikkose und Ketoazidose entwickelten, die Glukagonstimulierbarkeit der Adenylatzyklase sich kaum von den Kontrollen unterscheidet.

Abbildung 5

Dosisabhängigkeit der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase aus Lebern normaler und diabetischer Hamster. Einfluß von GTP auf die Hormonstimulierbarkeit.



2.2.2. Dosiswirkungskurve der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase bei Chinesischen Streifenhamstern mit GTP (Guanosintriphosphat) im Inkubationsmedium

Die gestrichelten Linien der Abb. 5 zeigen die steigernde Wirkung von GTP auf die Glukagonstimulation der Adenylatzyklase (näheres siehe Abschnitt 2.4.), während bei Inkubationsbedingungen ohne GTP kaum Unterschiede zwischen Kontrollen und Diabetes (Exp. I) vorhanden waren, zeigte die Glukagonstimulation unter GTP Zusatz (10^{-4} M) eine deutliche Steigerung, die nicht nur bei den Kontrollen (Exp. I und Exp. II), sondern auch im Diabetes zu beobachten war.

In Experiment I wurde durch 5 ug / ml Glukagon die Adenylatzyklase in Gegenwart von GTP bei den Kontrollen von 58 n Mol auf 98 n Mol (32 P) 3':5'-AMP / g x min. maximal stimuliert. Im Diabetes trat mit GTP noch eine weitere Steigerung auf 180 n Mol ein. Eine ähnliche Zunahme wurde auch in Experiment II beobachtet. Diese Testkonzentration von GTP betrug bei allen Versuchen 10^{-4} M.

2.3. Streptozotocindiabetes bei der Ratte (100 mg/kg)

2.3.1. Dosiswirkungskurve der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase ohne GTP im Inkubationsmedium

Um zu klären, ob die Schwere des Diabetes einen Einfluß auf die Glukagonwirkung im Adenylatzyklasesystem hat, wurde den Ratten eine höhere Dosis

Streptozotocin gespritzt: 100 mg/kg. i.v. Bei diesen Dosen entwickelten alle Tiere einen schweren Diabetes mit Blutzuckerwerten um ca. 400 mg%(s.Tab.5) sowie eine starke Exsikkose bei massiver Polyurie. Etwa die Hälfte der Tiere hatte außerdem eine starke Ketonurie, das Körpergewicht der Ratten nahm um ca. 10 Gramm ab (s.Tab.5), der Plasmainsulinspiegel sank um ca. 60 % gegenüber den Kontrollen (s.Tab.5). Ungefähr ein Drittel der Tiere starb im Laufe von 1-3 Tagen im Koma diabeticum. Allerdings waren unsere verwendeten Tierstämme wesentlich resistenter gegen das Streptozotozin als die anderer Autoren. Ein Vergleich unserer Blutzuckerwerte nach 100 mg/kg Streptozotozin (366 ± 99 mg% n= 20) mit denen von Schein und Alberti (89) (600 mg% ± 16 n = 9) läßt dies deutlich werden. Fig.6 zeigt die Dosiswirkungskurven der Glukagonstimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems aus Plasmamembranen normaler diabetischer Ratten. Aus der Darstellung wird klar, daß die Adenylatzyklase bei diesem ausgeprägten Diabetes empfindlicher auf Glukagon geworden ist, d.h. bei gleicher Hormonmenge im Testansatz mehr ATP zu 3':5'- AMP in der Zeiteinheit umsetzt.

Während dies bis zu einer Glukagonkonzentration von ca. 5×10^{-8} M fast nicht ins Gewicht fällt, stieg die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase unter diabetischer Stoffwechsellaage gegenüber der unter Normalbedingungen signifikant an. Dieser Effekt tritt etwa ab einer Glukagonkonzentration von 7×10^{-8} M auf. ($p < 0,01$ bei 5 ug/ml $p < 0,025$ bei 0,5 ug / ml entsprechend einer Glukagonkonzentration von ca. 7×10^{-8} M). Die Basalwerte und die Fluoridstimulation des Adenylatzyklasesystems veränderten sich nicht wesentlich (Tab 7).

Tabelle 5

Klinische Daten der untersuchten Tiere

	Körpergewicht (g)		Lebergewicht (g)	Blutzucker mg/100 ml	Insulinspiegel (IRI) uE / ml
	vor Streptozotocin	nach Streptozotocin			
Kontrollen	143±32 (n=29)		5,0±1,1 (n=29)	78±16,5 (n=30)	9,8±3,1 (n=30) P<0,01
Diabetes	146±21 (n=18)	132±20 (n=38)	6,0±1,6 (n=38)	366±99 (n=37)	4,3±2,9 (n=17) P<0,01
Diabetes + Insulin	151±6 (n=12)	177±38 (n=12)	10,6±2,5 (n=12)	153±94,8 (n=11)	-

Die Zahl n gibt die Anzahl der verwendeten Tiere an. Die gemessenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen ($\bar{x} \pm \sigma$) in beiden Tabellen.

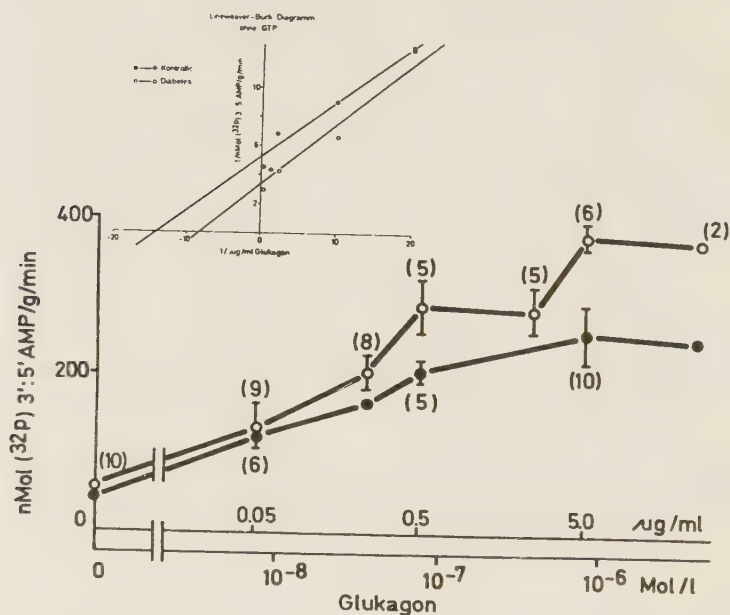
Tabelle 6

Plasmaspiegel von Glukagon (IRG), Bindung von Glukagon und Insulin an die Plasmamembran von Lebern normaler und diabetischer Ratten

	Kontrollen (n = 16)	Diabetes (n = 17)
IRG (pg/ml)	137 $\pm$ 41	211 $\pm$ 71 P<0,02
Glukagonbindung pg/mg Membran- protein	0,30 $\pm$ 0,09	0,10 $\pm$ 0,07 P<0,01
Insulinbindung pg/mg Membran- protein	0,93 $\pm$ 0,13	1,55 $\pm$ 0,11 P<0,01

Abbildung 6

Dosisabhängigkeit der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase aus Plasmamembranen von Lebern diabetischer und normaler Ratten (100 mg / kg Streptozotocin)



8

Jeder Kurvenpunkt stellt den Mittelwert aus der in Klammern angegebenen Anzahl von Membranpräparationen dar. Die bezeichneten Abweichungen nach oben und untern sind SEM Werte.

Der Einsatz in der Abbildung zeigt das aus den jeweiligen Kurvenpunkten abgeleitete Lineweaver- Burk- Diagramm ($1/V$ gegen $1/V$). Aus den Schnittpunkten der beiden Geraden mit der Abszisse ergeben sich die Affinitätskonstanten (K_a) des Adenylatzyklase-systems der diabetischen und der normalen Tiere: K_a (normal): 2×10^{-8} , K_a (diabetisch): $3,4 \times 10^{-8}$ Mol/l

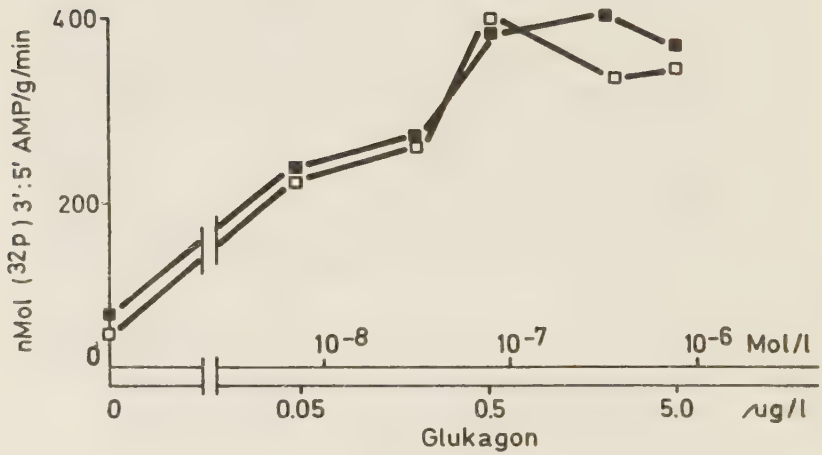
2.3.2. Vergleich zwischen der Bindung von Glukagon an die Plasmamembranen aus Lebern diabetischer (100 mg / kg) und normaler Ratten

In diesem Zusammenhang war zu prüfen, ob die beobachtete erhöhte Stimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems durch Glukagon möglicherweise durch eine vermehrte Bindung des Glukagons an die Plasmamembran zustandegekommen war. Aus den Versuchsergebnissen (Tab. 6) geht jedoch hervor, daß die Glukagonbindung um mehr als 50 % gegenüber den Kontrollen abgesunken waren. Die Plasmaglukagonspiegel stiegen demgegenüber um ca. 50 % an. Die Erhöhung des maximalen Glukagoneffektes auf die Adenylatzyklase im Diabetes steht damit nicht im Einklang mit der Glukagonbindung bei den diabetischen Ratten.

Ein anderer Grund für die erhöhte Glukagonstimulierbarkeit könnte in einer Veränderung der K_a des Adenylatzyklasesystems gegenüber Glukagon sein: K_a sollte dabei kleiner werden, wenn die Affinität des Systems größer wird. Aus der Auftragung nach Lineweaver-Burk ergaben sich für normale Ratten eine K_a von ca. $2 \times 10^{-8} M$, für die diabetischen eine K_a von $3,4 \times 10^{-8} M$ (Abb. 6 Einsatz). Die Affinität des Adenylatzyklasesystems gegenüber Glukagon sank damit im Diabetes geringgradig ab. Die mit ca. $2 \times 10^{-8} M$ gemessene K_a für normale Tiere liegt in einem höheren Bereich als von Pohl et al. (63), Pilkis et al. (61b) und Rodbell et al. (67) angegeben wurde. Möglicherweise ist die Art der Präparation der Plasmamembranen ein Grund dafür. (s. auch Abschnitt 1.3.) Diese Ergebnisse bestätigen die von Hepp (33) an groben

Abbildung 7

Dosisabhängigkeit der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase aus Lebern diabetischer (100 mg / kg) Ratten mit und ohne Ketonurie



Die offenen Kreise zeigen die Werte der nicht ketotischen Tiere, die geschlossenen Kreise die Ergebnisse bei den Tieren, bei denen eine Ketonurie aufgetreten war.

Partikelfractionen von Mäuselebern gemachte Beobachtung einer Erhöhung der maximalen Glukagonstimulierbarkeit der Adenylatzyklase. Ferner geht aus diesen Versuchen hervor, daß es im Diabetes neben einer Verminderung der Bindung von Glukagon an die Plasmamembran noch zusätzlich zu einer Verringerung der Affinität des Adenylatzyklasesystems gegenüber Glukagon gekommen ist.

2.3.3. Glukagonstimulierbarkeit bei Diabetes mit Ketonurie

Einer Gruppe von 8 Ratten wurde 100 mg / kg Streptozotocin gespritzt. Die Tiere entwickelten nach 1 - 2 Tagen einen schweren Diabetes (Abschnitt 2.3.1.). Nach 6 Tagen wurden die Plasmamembranen präpariert, wobei die Präparation in zwei getrennten Gruppen erfolgte: Eine Gruppe von Tieren, die zum Diabetes noch eine massive Ketonurie zeigten, und in eine mit solchen, die zwar schwer diabetisch waren, aber keinen Ketonurie aufwiesen. Die Dosiswirkungskurven der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase zeigten keinen Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Ketonurie im Diabetes (Abb.7)

2.4. Einfluß des Guanosintriphosphat (GTP) auf die Dosiswirkungskurven der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase bei normalen und diabetischen Ratten (100 mg/kg)

Seit längerem ist bekannt, daß GTP im Testansatz einen synergistischen Effekt auf die Glukagonstimulation hat, der von der GTP-Konzentration im Adenylatzykasetest abhängig ist (Rodbell et al. (67), Johnson et al. (41), Rodbell und Londos (68) Kimura und Nagata (43)). In den folgenden Versuchen wurde zum üblichen Testansatz noch GTP in einer Konzentration von 10^{-4} M hinzugefügt. Bei dieser Konzentration sollte es zu einem sicheren GTP-

Effekt kommen (Johnson et al. 41, Rodbell et al. 67). Abbildung 8 zeigt die Dosiswirkungskurven unter dem Einfluß von GTP. Der synergistische Effekt von GTP konnte bei der Kontrollgruppe bestätigt werden. Bei maximaler Glukagonstimulation mit $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ im Test ($= 5 \times 10^{-7} \text{M}$) ist der GTP-Effekt am größten (Abb.7 und Tab.7). Unter GTP-Einfluß zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Glukagonstimulierbarkeit um das 1,5 fache (von 256 ± 29 auf $386 \pm 10 \text{ nMol } 3':5'\text{-AMP/g} \times \text{min}$). Für normale Ratten fanden Johnson et al. (41) in etwa die gleichen Werte. Im Diabetes erhöhte sich die Glukagonstimulierbarkeit unter GTP Einfluß um mehr als das Doppelte: von 379 ± 32 auf $845 \pm 150 \text{ nMol } ^{32}\text{P } 3':5'\text{-AMP/g/min}$ (Tab.7). Der Einfluß von GTP auf die K_a der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase bei normalen Ratten haben Rodbell et al. (63) untersucht. Sie stellten fest, daß GTP die K_a um das ca. vierfache erniedrigt. Bei Auftragung der gemessenen Werte in ein Lineweaver-Burk Diagramm fanden wir ebenfalls eine Erniedrigung der K_a der Glukagonstimulation unter GTP Einfluß, die jedoch wesentlich geringer war, als die von Rodbell et al. angegebene. GTP erniedrigte die K_a von $2 \times 10^{-8} \text{M}$ auf etwa $1,5 \times 10^{-8} \text{M}$ (Abb. 8). Im Diabetes hatte GTP keinen weiteren Einfluß mehr auf die ohnehin schon erniedrigte K_a . Mit $3,4 \times 10^{-8} \text{M}$ ohne GTP und $3,7 \times 10^{-8} \text{M}$ mit GTP im Testansatz der Adenylatzyklase konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Der Einfluß des GTP auf die Basalaktivität (GTP im Testansatz ohne Glukagonstimulation) wurde in Vorversuchen geprüft. Die Aktivitäten betrugen $12 \pm 3 \text{ nMol}$ ohne und $10 \pm 1 \text{ nMol } (^{32}\text{P}) 3':5'\text{-AMP/g} \times \text{min}$. mit (10^{-4}M). Die niedrigeren Basalwerte gegenüber späteren Versuchen erklären sich daraus, daß bei

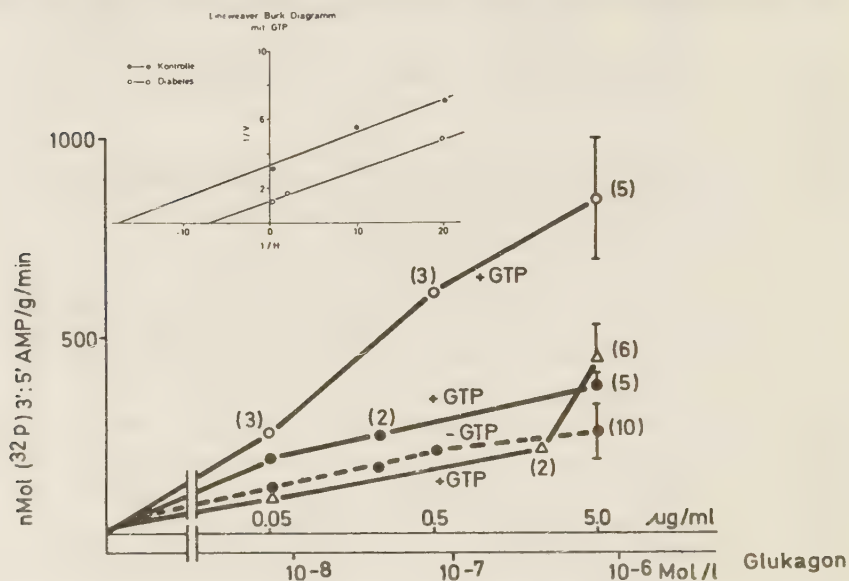
diesen Experimenten die rohe Membranfraktion nach Neville (57) verwendet wurde, während in späteren Versuchen die von Bachmann et al. (3) modifizierte Methode nach Ray (66) benutzt wurde. Diese Befunde stimmen mit denen von Rodbell et al. (67) Johnson et al. (41) und Kimura und Nagata (43) überein, die ebenfalls meist nur geringe Effekte des GTP auf die Basalaktivität fanden.

3. Die Glukagonstimulierbarkeit des Adenylatzyklase-
systems diabetischer Ratten (100 mg / kg)
nach Behandlung mit Insulin

Ratten, die mit 100 mg/ kg Streptozotocin diabetisch gemacht worden waren, wurden nach 3 tägiger Dauer des schweren z.T. ketotischen Diabetes mit Insulin s.c. behandelt. Den Tieren wurde drei Tage lang 2 x täglich 8 - 10 E eines Depotinsulins verabreicht. Danach wurden die Plasmamembranen präpariert und die Glukagonstimulation der Adenylatzyklase gemessen. Der Erfolg der Insulinbehandlung wurde mit Hilfe von Teststreifen kontrolliert. Die Blutzucker betrugen am Ende der Behandlung $153 \pm 94,8$ mg / 100 ml. ($\bar{x} \pm s$, n = 11). Die unterste Kurve in Abb. 8' zeigt die Dosiswirkungskurve für Glukagon bei insulinbehandelten Tieren. Die erhöhte Stimulierbarkeit, wie sie im Diabetes und insbesondere nach Zusatz von GTP in das Testmedium zu finden war, ging wieder auf Werte zurück, die unter denen der Kontrolle lagen. Diese Werte entsprechen denen, die bei Kontrollen ohne GTP-Zusatz gefunden wurden (gestrichelte Kurve der Abb. 8). Tabelle 7 macht deutlich, daß die unter diabetischer Stoffwechsellage mit GTP und 5 µg /ml Glukagon stimulierte Adenylatzyklase von 845 ± 150 (n = 5, $\bar{x} \pm$ S.E.M.) nach der Behandlung der Tiere mit Insulin auf 448 ± 93 (32 P) 3':5'-AMP nMol /g/min (p < 0,05) zurückgeht. Dies entspricht in etwa der Stimulation des Adenylatzy-

Abbildung 8

Dosisabhängigkeit der Glukagonstimulation der Adenylatzyklase aus Plasmamembranen von Lebern normaler, diabetischer (100 mg/kg) und diabetischer, mit Insulin behandelter Ratten. Einfluß von GTP auf die Hormonstimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems.



Jeder Kurvenpunkt stellt den Mittelwert aus der in Klammern angegebenen Anzahl von Membranpräparationen dar. Die bezeichneten Abweichungen entsprechen der SEM. Die geschlossenen Kreise zeichnen die Werte der Kontrollen an, die offenen die der diabetischen Tiere und die offenen dreieckigen Symbole die der mit Insulin behandelten Ratten. Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm im Einsatz links oben in dieser Abbildung können die Affinitätskonstanten (K_a) abgelesen werden:

K_a (normal): $1,5 \times 10^{-8}$ Mol/l, K_a (diabetisch): $3,7 \times 10^{-8}$ Mol/l

Tabelle 7

Statistische Prüfung der Unterschiede in der Glukagon-stimulation der Adenylatzyklase bei Diabetes und nach Behandlung der diabetischen Tiere mit Insulin

	Basal	Glukagon (5 ug/ml)	Glukagon + GTP	NaF (10 mM)
Kontrolle	54 $\pm$ 17 (n = 10)	256 $\pm$ 94 (n = 10)	386 $\pm$ 10 (n = 5)	428 $\pm$ 227 (n = 7)
Diabetes	56 $\pm$ 15 (n = 10)	379 $\pm$ 32 (n = 6)	845 $\pm$ 337 (n = 5)	498 $\pm$ 90 (n = 6)
Diabetes + Insulinbe- handlung	42 $\pm$ 12) (n = 5)	378 $\pm$ 112) (n = 5)	448 $\pm$ 228 (n = 6)	349 $\pm$ 76 (n = 6)
Kontrolle vs Diabetes	ns	p < 0,01	p < 0,025	ns
Diabetes vs Insulin	ns	ns	p < 0,05	ns
Insulin vs Kontrolle	ns	ns	ns	ns

Die Auswertung erfolgte mit dem t-Test für unverbundene Stichproben nach Student. Die Zahl n gibt die Anzahl der Membranpräparationen an, die gemessenen Enzymaktivitäten sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen ($\bar{x} \pm \sigma$); ns: nicht signifikant;

klasesystems mit GTP und Glukagon unter Normalbedingungen. Auffallend ist jedoch, daß die Glukagonstimulierbarkeit ohne GTP Zusatz im Testmedium auch nach Insulinbehandlung unverändert blieb. (2.Spalte, 3.Zeile in der Tabelle 7) Basal- und Fluoridwerte bleiben unverändert in allen Stoffwechsellagen. Die geringen Abweichungen, wie sie aus der Tab. 7 herausgelesen werden könnten, sind statistisch nicht signifikant.

IV. D I S K U S S I O N

1. Hepatische 3':5'-AMP Spiegel bei verschiedenen Stoffwechselsituationen

Erhöhte 3':5'-AMP Spiegel in der Leber diabetischer Ratten sind von mehreren Autoren beschrieben worden. Jefferson et al. (39) zeigten an perfundierten Lebern alloxandiabetischer Tiere eine Erhöhung der 3':5'-AMP-Spiegel, die nach Insulinbehandlung wieder zur Norm zurückkehrte. Außerdem konnten sie einen Zusammenhang zwischen den im Diabetes erhöhten 3':5'-AMP Spiegeln und der Glukosefreisetzung in das Perfusionsmedium feststellen, wenn die Versuchstiere kurz vor der Leberperfusion mit Anti-Insulinserum diabetisch gemacht worden waren. Bei Zugabe von Insulin ins Infusionsmedium erniedrigten sich beide Parameter wieder. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Exton et al. (21) sowie Pilkis et al. (61 a), Pilkis et al. (61 b) und Vesely et al. (87) fanden erhöhte 3':5'-AMP Spiegel auch bei streptozotocin-diabetischen Ratten. Im Fettgewebe dieser diabetischen Ratten fand sich ebenfalls ein erhöhter 3':5'-AMP Spiegel (Schimmel, 71). Eine Erhöhung der 3':5'-AMP-Konzentration in Leber, Muskeln und Fettgewebe wurde auch im Hunger beobachtet (Selawry et al. 72). Beim Menschen beschrieben Lilienfeld-Toal et al. (47) eine Erniedrigung der 3':5'-AMP Spiegel im Plasma insulinpflichtiger Diabetiker 15 Minuten nach Gabe von Insulin. Dieses Absinken des AMP ging mit einer Hypoglykämie einher. Dieses Versuchsergebnis wurde mit der Aktivierung der Phosphodiesterase in Zusammenhang gebracht. In bestimmten klinischen Situationen wie bei Operationen,

in denen ein Katabolismus vorherrscht, verändert sich das 3':5'-AMP im Blut ebenfalls: Madson et al. (51) beobachteten, daß nach einer bestimmten Zeit nach Operationsbeginn bei kleineren Eingriffen die 3':5'-AMP Spiegel niedriger sind als nach größeren. Auch das Plasmakortisol war bei größeren Eingriffen stärker erhöht als nach kleineren. Die Autoren nahmen für die Erhöhung eine hormonale Regulation an, bei der neben dem Kortisol auch die Katecholamine und das Glukagon beteiligt sein könnten. Cooper et al. (18a) fanden ein hormonsensitives Adenylatzyklasesystem in Ghosts menschlicher Fettzellen. Inkubierten sie diese mit Adrenalin und 5'Guanylyl-imido-diphosphat (G-p(NH)p-p), erhielten sie eine etwa 6-fache Stimulation gegenüber den Basalwerten. Allerdings bleibt die Frage offen, ob die Erhöhung des 3':5'-AMP (cyclisch) im Hunger und (oder) Diabetes allgemein gilt. So wies Stalmans (76) darauf hin, daß erhöhte 3':5'-AMP Spiegel in der Leber beim Diabetes der Ratte eher die Ausnahme als die Regel seien, da es viele Spezies gäbe, bei denen im Diabetes keine Erhöhung beobachtet wurde: Bishop et al. (11) fanden keine signifikanten Unterschiede im 3':5'-AMP Gehalt von Lebern normaler und pankreatektomierter Hunde. Bei Mäusen wurden von Van den Berghe (85) ähnliche 3':5'-AMP Spiegel im Diabetes wie bei den Kontrollen gemessen. Auch beim Menschen hat der Diabetes wahrscheinlich nur einen geringen Einfluß auf den 3':5'-AMP Gehalt der Leber. Liljenquist et al. (48) stellten keine wesentlichen Unterschiede in der Freisetzung von 3':5' AMP aus dem Splanchnikusgebiet bei Diabetikern gegenüber gesunden Probanden fest. Auch eine Glukagoninjektion änderte daran nichts. Lavine et al. (45) beobachteten einen paradoxen Abfall des 3':5'-AMP in der Leber genetisch adipöser Mäuse (sogenannter ob/ob Mäuse) im Hunger, während die normalen Mäuse

den erwarteten Anstieg zeigten.

2. Die hormonelle Regulation der 3':5'-AMP Spiegel

Die Frage nach der Regulation der 3':5'-AMP Spiegel in der Leber (und anderen Geweben) in verschiedenen Stoffwechselsituationen, wie Hunger oder Diabetes, ist noch immer nicht ganz geklärt. Mögliche Ursachen sind eine erniedrigte Aktivität der Phosphodiesterase (und) oder eine vermehrte Synthese von 3':5'-AMP aus ATP durch das Adenylatzyklesystem. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, fanden Pilkis et al. (61a) eine erniedrigte PDE-Aktivität in der Plasmamembran der Leber bei Diabetes, Senft et al. (73) eine Verminderung der PDE im Fettgewebe diabetischer Tiere.

Im Gegensatz zu Pilkis et al. (61b) beobachtete Hepp (33) eine im Diabetes erhöhte Glukagonstimulierbarkeit des Adenylatzyklesystems in einer groben Partikelfraktion von Mäuselebern.

Eine erhöhte Sensitivität des Lebergewebes gegenüber Glukagon im Hunger stellten Pauk et al. (62) an Ratten fest. Während der 3':5'-AMP Gehalt ohne die Stimulation mit Glukagon sich nicht wesentlich von dem bei normalen, gefütterten Tieren unterschied, stieg der 3':5'-AMP Spiegel bei Tieren im Hunger nach Glukagoninjektion etwa dreimal höher an als bei normalen Tieren, die die gleiche Glukagonmenge bekamen. Bei Wiederfütterung der hungernden Tiere ging die Glukagonstimulierte Erhöhung der 3':5'-AMP Spiegel wieder auf die Ausgangswerte zurück. Selawry et al. (72) interpretierten diese Befunde im Sinne einer erhöhten Sensitivität des Adenylatzyklesystems der Leber gegenüber Glukagon im Hunger.

In vorliegender Arbeit konnte an hochgereinigten Plasmamembranen aus Lebern schwer diabetischer Ratten gezeigt werden, daß die Erhöhung der hepatischen 3':5'-AMP Spiegel zumindest teilweise auf einer erhöhten Glukagonstimulierbarkeit des Adenylatzyklassesystems beruhen muß, da der Einfluß der PDE durch das "trapping system" weitgehend ausgeschaltet war. Die Erhöhung der Aktivität des Adenylatzyklassesystems beruhte dabei ausschließlich auf einer veränderten Hormonsensitivität, da das katalytische Zentrum (=NaF Stimulation) und die basale Aktivität (Enzymaktivität ohne Hormonzusatz im Inkubationsmedium) unverändert blieben, sowohl im Diabetes wie auch nach Insulinbehandlung der diabetischen Tiere. Der Widerspruch zu den Ergebnissen von Pilkis et al. (61b), der eine verminderte Glukagonempfindlichkeit des Adenylatzyklassesystems an Plasmamembranen aus Lebern streptozotocinbehandelter Ratten (bei unveränderten Basal- und Fluridaktivitäten) fand, dürfte zumindest teilweise darin bestehen, daß Hepp (33) Mäuse verwendete und (oder) der Diabetes in verschiedenen ausgeprägten Schweregraden das Adenylatzyklassesystem unterschiedlich beeinflusst:

Erzeugten wir bei Ratten einen Diabetes mit 80 mg/kg i.v. (Blutzucker $335 \pm$ mg/100 ml, n = 6), erhielten wir Dosiswirkungskurven der Glukagonstimulation der Adenylatzyklastase, die in etwa denen von Pilkis et al. (61 b) entsprachen (Fig.4). Bei schwerem Diabetes (100 mg/kg) mit teilweiser Ketonurie und ausgeprägter Exsikkose, verliefen die Dosiswirkungskurven deutlich verschieden von den Kontrollen. Die Glukagonstimulierbarkeit, besonders bei höheren Glukagonkonzentrationen, war größer geworden. Daher war zu vermuten, daß die Schwere des Diabetes einen

Einfluß auf die Stimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems haben könnte. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, daß auch andere klinische Parameter vom Schweregrad des Diabetes, d.h. von der injizierten Streptozotocinmenge, abhängen: Blutglukose, Plasmatriglyzeride, Plasma FFA, Ketonkörper u.a.m. (Schein, Alberti et al. 69).

3. Unterschiedliche Hormonstimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems in verschiedenen Stoffwechselsituationen - Rolle des GTP bei der Signalübertragung

Eine erhöhte Hormonsensitivität des Fettgewebes diabetischer Ratten wurde von Zapf et al. (93) festgestellt. Die lipolytische Antwort (FFA- und Glyzerinfreisetzung, FFA im Gewebe) ist bei gleicher Adrenalinkonzentration im Diabetes erhöht. Die Affinität des Fettgewebes zu den Hormonen ist dabei um das ca. 5- bis 10-fache höher als bei den Kontrollen. Die Autoren führten die erhöhte Hormonsensitivität auf drei mögliche Mechanismen zurück: i) vermehrte Hormonbindung im Diabetes, ii) erhöhte 3':5'-AMP Bildung durch ein im Diabetes auf Hormone empfindlicher reagierendes Adenylatzyklasesystem, iii) veränderte Aktivierbarkeiten der 3':5'-AMP-abhängigen Proteinkinasen und Triglyzeridlipasen im Fettgewebe diabetischer Tiere (Zumstein et al. 94)

Eine vermehrte Hormonbindung kommt hier als Ursache nicht in Frage, da wir im Gegenteil eine um mehr als 50 %ige Verminderung der Bindung von Glukagon an die Plasmamembranen im Diabetes beobachteten. Die von Zapf (93) diskutierte Erhöhung der Hormonempfindlichkeit des Adenylatzyklasesystems konnte in dieser Arbeit an einer hochgereinigten Plasmamembranpräparation nachgewiesen werden. Die auch im

Diabetes unveränderten Basal- und Fluoridwerte schließen eine mögliche Enzymvermehrung ebenso aus, wie einen erhöhten endogenen Glukagongehalt an den Plasmamembranen, der sich in einer gegenüber der Kontrolle erhöhten Basalaktivität äußern könnte. Trotz der im Diabetes erhöhten Glukagonstimulierbarkeit der Adenylatzyklase wurde in dieser Arbeit paradoxerweise eine Erniedrigung der Affinität des Adenylatzyklasesystems gegenüber Glukagon im Diabetes festgestellt.

Eine Verminderung der Affinität gegenüber Glukagon (und ACTH) fanden auch Zapf et al. (93) im Fettgewebe diabetischer Ratten, obwohl, wie vorhin erwähnt, die Empfindlichkeit gegenüber Adrenalin angestiegen war. Wagle et al. (88) stellten fest, daß bei alloxandiabetischen Ratten, die mit Insulin behandelt worden waren, nach 72-stündigem Entzug des Insulins, das Glukagon die intrahepatischen 3':5'-AMP Spiegel weniger erhöht als bei Fortführung der Insulinbehandlung. Bei der fetalen Leber wurde eine verminderte Glukagonsensitivität der Adenylatzyklase gegenüber ausgewachsenen Tieren beschrieben (Blasquez et al. 14). Die Autoren fanden bei unveränderten Basal- und Fluoridwerten eine verminderte Adenylatzyklaseantwort auf Glukagon. Diese ging mit einer ebenfalls verminderten Bindung von Glukagon an die Leberplasmamembran einher. Mit zunehmendem Alter der Föten stieg die Bindung von Glukagon ebenso an wie die Glukagonstimulierbarkeit der Adenylatzyklase. Nach wenigen Wochen erreichten beide Parameter dann die Werte der erwachsenen Tiere.

Unsere Ergebnisse (verminderte Glukagonbindung im Diabetes, verminderte Affinität des Adenylatzyklasesystems) verminderte bzw. nur wenig veränderte

Glukagonstimulierbarkeit der Adenylatzyklase bei relativ mildem Diabetes stehen im Einklang mit den zitierten Autoren (Pilkis et al. 61 a, b).

Wird jedoch der klinische Verlauf des Diabetes schwerer und kommt es zu einer weitgehenden Stoffwechselentgleisung, steigt die Glukagonstimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems an, vor allem bei hohen Glukagon-Konzentrationen obwohl die Affinität und die Bindung des Glukagons vermindert sind. Daraus muß geschlossen werden, daß in erster Linie die Überträgermechanismen zwischen dem Glukagonrezeptor und der katalytischen Einheit beim schweren Diabetes verändert sein müssen. Da die Guanylnukleotide (Übersicht bei Helmreich 36, Rodbell und Londos 68, Kimura und Nagata 43), insbesondere das GTP und das GDP (Rodbell et al. 67) eine wichtige Rolle in der Vermittlung des Hormonsignals auf das katalytische Zentrum des Adenylatzyklasesystems spielen, und außerdem das GTP die Affinität dieses Systems gegenüber dem Glukagon um das ca. 4-fache erhöht (Die K_a betrug ohne GTP $2 \times 10^{-9}M$, mit GTP $0,5 \times 10^{-9}M$, Rodbell et al. 67), wurde in vorliegender Arbeit auch der Einfluß des GTP auf die Glukagonstimulation der Adenylatzyklase in diabetischer Stoffwechsel-lage untersucht. Dabei zeigte sich, daß GTP im Diabetes das glukagonabhängige Adenylatzyklasesystem stärker stimuliert als unter normalen Stoffwechselverhältnissen (Abb. 8 und Tabelle 7). Der synergistische Effekt des GTP auf die maximal mit Glukagon stimulierte Adenylatzyklase (mit $5 \mu g/ml$ Glukagon) betrug bei Kontrollen etwa 1,5 (Glukagonstimulation + GTP / Glukagonstimulation -GTP), bei

Diabetes erhöhte sich dieses Verhältnis (Glukagonstimulation + GTP / Glukagonstimulation - GTP) auf etwa 2,2. Auch bei den Chinesischen Streifenhamstern konnte ein ähnlicher Effekt nachgewiesen werden (Abb. 4).

Laudat und Pairault (46) zeigten an genetisch fett-süchtigen Mäusen (ob/ob Mäusen), die neben einer Hyperadipositas auch eine Hyperglykämie und Hyperinsulinämie hatten, daß diese Stoffwechsellage einen Einfluß auf die Hormonstimulierbarkeit der Adenylatzyklase ausübte, ohne daß sich dabei die Basal- oder Fluoridwerte änderten. Im Fettgewebe fand sich eine erniedrigte Adrenalinempfindlichkeit im Vergleich zu den Kontrollen. Die Autoren untersuchten auch den Einfluß dieser Stoffwechselsituation auf die GTP stimulierte, adrenalinabhängige Adenylatzyklase. Sie fanden bei normalen und den fettsüchtigen Mäusen keine Unterschiede im GTP-Effekt auf die Hormonstimulation. Obwohl die Affinität der Rezeptoren für Adrenalin im Laufe des Lebens dieser Tiere in etwa gleich blieb, sank die Hormonempfindlichkeit laufend ab. Die Autoren schlossen daraus eine fortschreitende Entkopplung zwischen dem Hormon-Rezeptor-Komplex und dem katalytischen Zentrum. Eine ähnliche Diskrepanz, wenn auch in umgekehrter Richtung, legen die Befunde dieser Arbeit nahe: Trotz einer erniedrigten Affinität kommt es zu einer erhöhten Glukagonstimulation und einer Vermehrung des GTP-Einflusses auf die Adenylatzyklase im Diabetes. Daß GTP tatsächlich zur Hormonstimulation essentiell ist, zeigten Kimura und Nagata (43) mit einer hoch gereinigten ATP Präparation im Adenylatzyklase-

test. Verwendeten sie eine solche ATP Präparation, war die Stimulation des Adenylatzyklasesystem mit Glukagon nur gering. Gaben sie jedoch eine bei der ATP Reinigung abgetrennte Fraktion, die sich chromatographisch und spektroskopisch als mit GTP identisch erwies, wieder dem Test hinzu, ergab sich wieder eine deutliche Stimulation mit Glukagon. Die Ergebnisse der Dosiswirkungskurven (Abb. 6 ohne GTP, Abb 8 mit GTP) lassen sich an Hand dieser Ergebnisse interpretieren. Die gesteigerte Glukagonstimulation im Diabetes ist einem gesteigerten GTP-Effekt zuzuschreiben, wobei in den Versuchen der Abb 6 im Test zwar kein GTP zugesetzt war, dieses aber möglicherweise als Verunreinigung in dem verwendeten ATP vorhanden war. Ob dies wahrscheinlich ist, war nicht zu entscheiden, da bei dem verwendeten ATP (Boehringer, Mannheim) GTP oder andere Guanylnukleotide unter der Nachweisgrenze von 0,3 % blieben. (Fa. Boehringer, Tutzing, Testlabor, pers. Mitteilung).

Daß dieser GTP Effekt ein von der Stoffwechsellage abhängiger Prozeß ist, zeigte sich im Rückgang des vermehrten GTP Effektes nach Insulinbehandlung der diabetischen Tiere in vivo.

Der gesteigerte GTP Effekt auf die Glukagonstimulation könnte auf folgenden Mechanismen beruhen:

- i) GDP und GTP werden an der diabetischen Membran langsamer abgebaut und stehen somit vermehrt der Glukagonstimulation zur Verfügung,
- ii) die zur Hormonstimulation notwendige Lipidphase der Membran ist im Diabetes verändert und führt damit zu einer besseren Stimulation durch GTP und Glukagon,

iii) im Diabetes werden mehr aktivierende Guanylnukleotide an die Membran gebunden,

iv) das in den Aktivierungsprozeß eingreifende Guanylnukleotid-Bindungs-Protein (Pfeuffer und Helmreich 60) ist bei diabetischer Stoffwechsellaage aktiviert.

zu i)

Da die an die Membran gebundene 5' Nukleotidase neben Adenylnukleotiden: auch Guanylnukleotide abbaut (Barmann 5) und die ATPasen auch GTP zu GDP und P_i hydrolysieren können (Barman, 5a) wäre ein erhöhter GTP-Effekt auf die Glukagonstimulation der Adenylatzyklase im Diabetes durch eine Verminderung des GTP-Abbaues an den Membranen diabetischer Lebern während der Inkubation denkbar. Tatsächlich fand Pilkis et al. (61b) eine leichte Erniedrigung der ATPase im Diabetes, die aber in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden konnte (Tabelle 1) Jarrett (38) fand eine durch Insulin stimulierbare Mg^{2+} ATPase, die bei Insulinmangel resp. Diabetes erniedrigt sein und somit für einen verminderten Abbau der Adenin- und Guaninukleotide verantwortlich sein könnte. Diese stünden dann vermehrt dem Überträgermechanismus der Adenylatzyklase zur Verfügung.

Daß demgegenüber zumindest während der Inkubation der Adenylatzyklase die GTP Konzentration konstant bleibt, ^{legt} nahe: i) der ca. 10-fache Überschuß an GTP ($10^{-4}M$) gegenüber der Konzentration, die für einen maximalen Effekt des GTP auf die Glukagonstimulation notwendig ist (Johnson et al. 41: $10^{-5}M$), und ii) das im Test verwendete Reagerationssystem mit Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase: Dieses System kann nämlich auch GDP wieder zu GTP aufphosphorylieren (Vesely et al. 87).

zu ii)

Da zur Glukagonaktivierung die Lipidphase der Membran notwendig ist (Birnbaumer und Rodbell et al. 8) und künstliche Veränderungen der Membranlipide, vor allem der Phospholipide, eine Veränderung der Glukagonstimulierbarkeit bewirken (Houslay et al. 37), wäre eine gesteigerte GTP- und Glukagonwirkung auf dieses Enzymsystem durch eine im Diabetes veränderte Lipidzusammensetzung der Membran denkbar. Dies ist jedoch nicht wahrscheinlich, da

a) Pilkis et al. (61b) keine wesentlichen Unterschiede im Lipidgehalt und membrangebundenen Phosphor zwischen normalen und diabetischen Ratten gefunden hat,

b) Housley et al. (37) zeigen konnten, daß die Stimulation der Adenylatzyklase mit dem GTP-Analogen GMP-P-(NH)-P, ebenso wie die Fluoridstimulation ziemlich unabhängig von der Lipidumgebung in der Membran ist.

Die experimentellen Veränderungen in den Membranlipiden durch Fusion bzw. Substitution bestimmter Phospholipide (z.B. mit Dimyristoyl-phosphatidylcholin) bewegten sich in einer Größenordnung von ca. 40 - 60 % des totalen Lipidpools der Membran (Housley et al., 37). Diese große Veränderung scheint jedoch auch im Diabetes unwahrscheinlich zu sein, zumal alle von den Autoren herbeigeführten Veränderungen in der Membran die Glukagonstimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems herabsetzten, während im Diabetes ja eine Erhöhung eintritt.

c) Whitig et al. (91) keine wesentlichen Unterschiede im Einbau von Glycerinphosphat weder in die totale Lipidfraktion noch in die neutralen Lipide der Leber normaler und diabetischer Ratten gefunden hat.

zu iii)

Ob an die Membran diabetischer Tiere mehr Guanylnukleotide gebunden werden, die dann für eine vermehrte Glukagonstimulation unter Guanylnukleotideeinfluß verantwortlich sein könnten, müßte ein Vergleich der Bindungen dieser Substanzen (GTP, GDP, GMP-P-(NH)-P usw.) an die Plasmamembranen normaler mit diabetischen und diabetischen anschließend mit Insulin behandelten Tiere ergeben. Experimentelle Daten stehen derzeit nur für normale Tiere zur Verfügung (Salomon und Rodbell 70 b).

zu IV)

Die Guanylnukleotide werden an eine regulatorische Untereinheit der Adenylatzyklase gebunden (Helmreich 36) die bei Taubenerythrozyten bereits isoliert werden konnte (Pfeuffer und Helmreich 60). Hanoune (30a) fand beim adrenalin sensitiven Adenylatzyklasesystem der Leber einen zur Hormonstimulation notwendigen, löslichen Faktor, der GTP Eigenschaften zeigte. Der Autor vermutete ein GTP bindendes Protein, welches in der Signalübertragung eine Rolle spielen könnte. Dieses Guanylnukleotid-Bindungsprotein wird in Abwesenheit von Guanylnukleotiden an das katalytische Zentrum der Adenylatzyklase gebunden und hält es in inaktivem Zustand. Bei Bindung mit Guanylnukleotiden dissoziiert dieses vom katalytischen Zentrum ab, so daß es dann im aktivem Zustand vorliegt. Dabei spielt wahrscheinlich ein allosterischer Effekt eine Rolle (Helmreich 36, Rodbell und Londos 68). Da bei unseren Versuchen das katalytische Zentrum unverändert blieb, könnte der gesteigerte GTP-Effekt in einem im Diabetes aktivierten Guanylnukleotidbindungsprotein zu suchen sein.

4. Die Bedeutung von Glukagon und Insulin
auf die Pathogenese des Diabetes und die
Regulation des Adenylatzyklasesystems

Die Frage, welche Bedeutung die Veränderungen des Plasmaspiegels von Insulin und Glukagon im Diabetes auf Glucosebildung und Adenylatzyklasesystem haben, soll etwas näher erläutert werden. Viele Stoffwechselleistungen der Leber (z.B. Glukoneogenese, Glykogenolyse) sind abhängig von den Spiegeln des Insulins und des Glukagons (I:G Verhältnis; Unger 85, Felig et al. 23). Das I:G Verhältnis wiederum hängt von verschiedenen Stoffwechselsituationen ab, wie Hunger, Glukoseinfusionen, kohlenhydratarmer Kost u.a. m. (Unger 85)

Im Diabetes ändert sich das I:G Verhältnis zugunsten des Glukagons. Höhere Glukagonspiegel finden sich unter anderem beim Alloxandibetes des Hundes (Müller et al. 56) und beim Streptozotocindibetes der Ratte (Katsilambros et al. 42). Auch in der vorliegenden Arbeit fanden sich im Diabetes erhöhte Glukagonspiegel, das I:G Verhältnis war um das ca. 3-fache zugunsten des Glukagons abgesunken. Der erhöhte Glukagonspiegel kann aber nicht allein für die metabolischen Veränderungen in der Leber (Erniedrigung des Glykogenspiegels: Pilakis et al. 61 b, Erhöhung der Glukoneogenese: Exton et al. 21 verantwortlich sein, weil z.B. i.v. Infusion einer physiologischen Menge von Glukagon bei gesunden Probanden nur vorübergehende Blutglukoseerhöhungen verursacht. (Felig et al 23). Auch bei Diabetikern verursachte Glukagon keine wesentlichen Änderungen von Blutglukose und Ketonkörpern. Erst bei vollständigem Insulin-

mangel konnte ein Glukagoneffekt erzielt werden. Sherwin et al. (75), Felig et al. (23) schlossen daraus, daß ein Glukagoneffekt auf die Glukoseproduktion der Leber bei normaler und diabetischen Verhältnissen nur dann zu beobachten ist, wenn ein Insulinmangel herrscht.

Für die Pathogenese des Diabetes käme daher eher ein Insulinmangel als ein Glukagonüberschuß in Frage (Sakurai et al. 74, Sherwin et al. 75). Ein weiterer Hinweis dafür war die Feststellung, daß bei längerer Infusion von Somatostatin, das die Sekretion von Glukagon und Insulin im Pankreas hemmt (Alberti et al. 1, Gerlicher et al. 29) zunächst bei gesunden Probanden und bei Diabetikern ein Abfall der Blutglukose auftritt, der später aber verschwindet und in einen Anstieg der Blutglukose übergeht, obwohl die Glukagonsekretion ebenso wie die des Insulins durch die Somatostatinfusion gehemmt blieben.

Wird die gesteigerte Glukagonstimulierbarkeit des Adenylatzyklassesystems, welche mit großer Wahrscheinlichkeit auf einem im Diabetes gesteigerten GTP-Effekt auf die Hormonstimulierbarkeit beruht, durch den Glukagonüberschuß oder den Insulinmangel im Diabetes verursacht? An einer groben Leberpartikelfraktion konnten Hepp und Renner (32) einen Antagonismus zwischen Insulin und Glukagon in vitro am Adenylatzyklassesystem zeigen. Auch andere Autoren fanden solche Effekte, meist an groben Membranpräparationen (Übersicht bei Cuatrecasas 19). Bei gereinigten Plasmamembranen ist der inhibierende Einfluß des Insulins auf die mit submaximalen Glukagonkonzentrationen stimulierte Adenylatzyklastase (Hepp 33) nur schwer darzustellen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte

in Vorversuchen an hochgereinigten Plasmazellmembranen kein inhibierender Effekt von Insulin auf die mit Glukagon stimulierte Adenylatzyklase beobachtet werden. (Übersicht über den Insulineffekt auf das Adenylatzyklasesystem bei Cuatrecasas (19), Hepp (33), Pilkis 61 b). Trotz dieser negativen Befunde an hochgereinigten Plasmamembranpräparationen kann die wichtige Rolle des Insulins in der Regulation der glukagonstimulierten Adenylatzyklase nicht grundsätzlich in Frage gestellt werden. Hepp (33) diskutierte einen wechselseitigen Einfluß von Glukagon und Insulin auf das Adenylatzyklasesystem in der Leber hinsichtlich seiner Bedeutung im Stoffwechsel.

Ein Insulinmangel bzw. eine Verminderung der Insulinspiegel, wie er im Diabetes herrscht, greift demnach in die hormonellen Aktivierungsmechanismen der Adenylatzyklase ein: So konnte an Fettzellghosts normaler Ratten (Hepp und Renner 32) und an einer groben Partikelfraktion aus Lebern normaler Mäuse (Hepp 33) gezeigt werden, daß die mit submaximalen Glukagondosen stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität in Gegenwart von 100 μ U/ml Insulin im Testmedium um ca. 40 % gegenüber der Glukagonstimulation ohne Insulin gesunken war. Da wir bei unseren diabetischen Ratten (100 mg/kg) einen ca. 50 %igen Abfall des IRI beobachteten (Tabelle 5), kann der Anstieg der Glukagonstimulierbarkeit und der verstärkte GTP-Effekt auf das Adenylatzyklasesystem im Diabetes im Sinne der obengenannten Befunde als Folge eines Insulinmangels gedeutet werden. Die Normalisierung des erhöhten GTP-Effektes und der Glukagonstimulierbarkeit nach Behandlung

der diabetischen Tiere mit Insulin steht mit dieser Interpretation im Einklang. An welcher Stelle das Insulin in den hormonellen Aktivierungsmechanismus eingreift, bleibt weitgehend unbekannt. Wasner (90, 89) erörterte eine Regulation der Hormonstimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems über eine membrangebundene Proteinkinase bzw. eine Phosphoproteinphosphatase, wobei dem Insulin eine wichtige Rolle zukommen würde. Inwieweit dies vor allem für eine diabetische Stoffwechsellage zutreffen könnte, müßten weitere Versuche zeigen. Die verminderte Glukagonbindung und die erniedrigte Glukagonaffinität des Adenylatzyklasesystems im Diabetes sind weitere Gründe, die ebenfalls eher einen Insulinmangel als einen Glukagonüberschuß für die Pathogenese des Diabetes wahrscheinlich machen. Teleologisch gesehen könnte man letztere beiden Befunde als Schutz gegen die erhöhte Glukagonanflutung an die Leber deuten. Blasquez et al. (14) interpretierten die verminderte Glukagonstimulierbarkeit und -bindung während der Schwangerschaft bei Rattenföten im Sinne einer "down regulation" gegenüber den in utero zirkulierenden relativ hohen Glukagonspiegeln. Der Föt kann sich so gegen das katabole Hormon Glukagon schützen.

Addendum

Nach Abschluß dieser Arbeit konnten Soman und Felig (95) die Ergebnisse unserer Versuche weitgehend bestätigen. Auch sie fanden im Gegensatz zu Pilkis et al. (61 b) eine erhöhte Glukagonstimulierbarkeit des Adenylatzyklasesystems im Diabetes bei Ratten, wobei die NaF-Stimulierbarkeit unverändert geblieben war. Nach ausreichender Insulinbehandlung erfolgte eine Rückkehr zur Norm. Diese Autoren diskutierten die Veränderungen der Glukagonstimulierbarkeit ebenfalls im Zusammenhang mit der Schwere des Diabetes und der unterschiedlichen Gewinnung der Plasmamembranen. Die im Gegensatz zu uns gefundene erhöhte Glukagonbindung im Diabetes hingegen bedarf weiterer Abklärung.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Ausgehend von erhöhten 3':5'AMP Spiegeln in der Rattenleber unter diabetischer Stoffwechsellage, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß daran das Adenylatzyklasesystem maßgeblich beteiligt ist. Die erhöhte Aktivität der Adenylatzyklase beruht dabei fast ausschließlich auf einer erhöhten Stimulierbarkeit durch Glukagon, da die Basal- und Fluoridwerte gegenüber den Kontrollen fast unverändert blieben und die Phosphodiesterase blockiert war. Die von Hepp (1972) an einer groben Partikelfraktion aus Mäuselebern gefundenen Veränderungen der Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase im Streptozotocin-diabetes konnten in dieser Arbeit auch an einer hochgereinigten Plasmamembranfraktion nachgewiesen werden. Die erhöhte Stimulierbarkeit durch Glukagon beruht dabei nicht auf einer vermehrten Glukagonbindung an die Membran oder auf einer erhöhten Affinität des Adenylatzyklasesystems gegenüber Glukagon (erniedrigte K_a), sondern auf einer Veränderung des Überträgermechanismus, der zwischen dem Hormonrezeptor und der katalytischen Einheit der Adenylatzyklase liegt. Obwohl nicht alle Komponenten der Signalübertragung bekannt sind, spielen hierbei die Guanylnukleotide eine wichtige Rolle. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, daß der synergistische Effekt des GTP auf die Glukagonstimulation der Adenylatzyklase im Diabetes verstärkt ist und daher die erhöhte Glukagonstimulierbarkeit zumindest teilweise durch einen im Diabetes verstärkten GTP Effekt zu erklären ist.

Der Rückgang dieser Erhöhung zu Kontrollwerten nach Insulinbehandlung der diabetischen Tiere legt eine Rolle des Insulins in der Kontrolle des Adenylatzyklesystems nahe. In der Diskussion wurden mögliche Gründe für den erhöhten GTP Effekt erörtert und die Bedeutung der Glukagon- und Insulinspiegel in der Pathogenese des Diabetes und der Hormonregulierbarkeit des Adenylatzyklesystems dargelegt. Dabei wurde vor allem der Insulinmangel und weniger der Glukagonüberschuß als mögliche Ursachen der erhöhten Glukagonstimulierbarkeit der Adenylatzykase im Streptozotocindiabetes herausgestellt.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Alberti K.G., Christensen N.J.
Christensen S.E., Prange Hansen A.P.,
Oversen J., Lundback K., Seyer-Hansen K.
Örskov H.

Inhibition of Insulin Secretion by Somatostatin
Lancet 2, 1299 - 1301 (1973)
2. Appleman M.M., Thompson W.J., Russell T.R.

Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase
Adv.Cyclic Nucleotide Res. 3,65 - 68 (1973)
3. Bachmann W., Harms E., Hassels B.
Henninger H.P., Reutter W.

Studies in Rat Liver Membranes
Biochem.J. 166, 455 - 462 (1977)
4. Bär H.P., Hechter O.

Adenylate Cyclase Assay in Fat Cell Ghosts
Anal. Biochem. 29, 476 - 480 (1969)
5. Barman Th.
5' Nucleotidase
Enzyme Handbook II, 588 (1969)
- 5a. Barman Th.
ATP-ase
Enzyme Handbook II, 689 - 690 (1969)
6. Benjamin W.B., Singer J.

Actions of Insulin, Epinephrine, and Dibutyl
Cyclic Monophosphate on Fat Cell Protein
Phosphorylations. c AMP Dependent and
Independent Mechanisms

Biochemistry 14, 3301 - 09 (1975)

7. Birnbaumer L., Pohl, Rodbell M.
Adenylate Cyclase in Fat Cells. I. Properties
and the Effect of Adrenocorticotropin and
Fluoride
J. Biol. Chem. 244, 3468 - 75 (1969)
8. Birnbaumer L., Pohl L.S., Rodbell M.
The Glucagon-sensitive Adenyl Cyclase System
in Plasma Membranes of Rat Liver
J. Biol. Chem. 246, 1857 - 60 (1971)
9. Birnbaumer L., Pohl S.L.
Relation of Glucagon-Specific Binding Sites
to Glucagon Dependent Stimulation of Adenyl
Cyclase Activity in Plasma Membranes of
Rat Liver
J. Biol. Chem. 248, 2056 - 61 (1973)
10. Bishop J.S., Larner J.
Presence in Liver of a 3':5' cyclic AMP
stimulated Kinase for the I Form of UDPG
-Glycogen-Glucosyltransferase.
Biochem. Biophys. Acta 171, 374 - 79 (1969)
11. Bishop J.S. Goldberg N.O., Larner J.
Insulin Regulation of Hepatic Glycogen
Metabolism in the Dog
Am. J. Physiol. 220, 449 - 505, (1971)
12. Bitensky M.W., Russell V., Robertson W.
Evidence for Separate Epinephrine and Glucagon
Responsive Adenyl Cyclase Systems in Rat Liver
Biochem. Biophys. Res. Comm. 31 706 - 12 (1968)
13. Bitensky M.W. Russell V., Blanco M.
Independent Variation of Glucagon and
Epinephrine Responsive Components of Hepatic
Adenylate Cyclase as a Function of Age, Sex
and Steroid Hormones
Endocrinology 86, 154 - 59 (1970)

14. Blasquez E. Rubalcava B., Montesano R.,
Ora L., Unger R.

Development of Insulin and Glucagon Binding
and the Adenylate Cyclase Response in Liver
Membranes of the Prenatal, Postnatal and
Adult Rat; Evidence of Glucagon Resistance
Endocrinology 98, 1014 - 23 (1976)

15. Butcher R.W., Baird C.E.
The Role of Adenosine 3':5'-Monophosphate in Hormonal
Action

Pharmacol. Rev. 25 ,7 - 14 (1966)

16. Butcher R.W. Mey H.C., Ho R.J., Sutherland E.W.

Effects of Lipolytic and Antilipolytic
Substances on Adenosin 3':5'-Monophosphate
Levels in isolated fat Cells

J. Biol.Chem. 243 1705 - 12 (1968)

17. Corbin J.D., Reiman E.M. Walsh D.A., Krebs E.G.

Activation of Adipose Tissue Lipase by Skeletal
Muscle c.Adenosine 3':5' monophosphate Stimu-
lated Protein kinase

J.Biol.Chem. 245 4859 - 51 (1970)

18. Emmelot P., Bos C.J.

Studies on Plasma Membranes of Rat Liver

Biochim.Biophys. Acta 120, 369 - 82 (1962)

- 18a. Cooper B., Partilla J.S., Gregerman R.J.

Adenylate Cyclase of Human Fat Cells

J. of Clin. Invest. 56, 1350 - 53 (1975)

19. Cuatrecasas P.

Initial Biochemical Consequences of Insulin
Receptor Complexes in Hormone Receptors
and Cell Membranes

Adv. Cyclic ...

Nucleotide Research., Vol. 5 97-99 (1975)

20. de Duve C., Pressmann B.C., Ganetto R., Wattiaux R., Applemans F.
Glucose 6-phosphatase, Isolation and Properties
Biochem. J. 60, 604 - 17 (1955)
21. Exton J.H., Park C.R.
Control of Gluconeogenesis in Liver
J.Biol.Chem. 243, 4188 - 96 (1968)
22. Exton J.H., Robison G.A., Sutherland E.W., Park C.R.
Studies on the Role of Adenosine 3':5' Monophosphate in the Hepatic Actions of Glucagon and Catecholamines
J.Biol.Chem. 246, 20, 6166 - 77 (1971)
23. Felig P., Wahren J., Hendler R.
Influence of Physiologic Hyperglukagonemia on Basal and Insulin inhibited Splanchnic Glucose Output in Normal Man
J.Clin Invest. 58, 761 - 65 (1976)
24. Freychet P.
Interaction of Polypeptide Hormones with Cell Membrane Specific Receptors: Studies with Insulin and Glucagon
Diabetologia
12, 83 - 100 (1976)
25. Frerichs H., Creutzfeldt W.
Der Experimentell chemische Diabetes
Handbuch der experimentellen Pharmakologie Bd. XXXII/1
Hrsg. Dornbach E., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1971 S. 185
26. Garrison J.C. Haynes R.C.
Hormonal Control of Glycogenolysis and Gluconeogenesis in Isolated Rat Liver Cells
J.Biol.Chem. 248, 5333 - 43, (1973)

27. Gerritsen J.C., Dulin E.W.
Streptozotocin Induced Diabetes in the Rat
6. Congr. Inter.Diabetes Fed.(Stockholm 1967)
Intern. Congr.Series No 140
Abs. 256 Excerpta Med. Found. Amsterdam
28. Goldberg N.D., Dietz S.B., O'Toole A.G.
Cyclic Guanosine 3':5'-Monophosphate in
Mammalian Tissue and Urine
J.Biol.Chem. 4458 - 66 (1969)
Gerich J., Lorenzi MV., Schneider V., Karam J.
29. Effects of Somatostatin on Plasma Glucose and Gluca-
gon Levels in Human Diabetes Mellitus
N.Engl. J. Med. 291 , 541 - 47 (1974)
30. Hales C.N., Randle P.J.
Immunoassay of Insulin with Insulin -
Antibody Precipitate
Biochem. J. 88, 137 - 145 (1963)
- 30a. Hanoune J.
The Epinephrine Sensitive Adenylate
Cyclase System
Hormones and Cell Regulation Vol.2
75 - 88 (1978)
31. Hepp K.D., Edel R., Wieland O.
Hormone Action on Liver Adenylate
Cyclase Activity
Eur.J. Biochem. 17, 171 - 77 (1970)
32. Hepp K.D., Renner R.
Insulin Action on the Adenylate Cyclase
System:Antagonismus to Activation by
Lipolytic Hormones
FEBS Letters 20 191 - 194 (1972)

33. Hepp K.D.

Adenylate Cyclase and Insulin Action

Eur.J.Biochem. 31 266 - 76 (1972)

34. Hepp K.D., Renner R., Häring H.U.

Cyclic AMP and the Control of Lipolysis in
Fat Cells of the Rat

Eucaryotic Cell Function and Growth

Dumont J.E. Brown B.L. eds.

Plenum Publishing Corp. New York (1976)S.567

35. Hepp K.D., Langley J., v.Fucke H.J.,
Renner R. Kemmler W.

Increased Insulin Binding Capacity of
Liver Membranes from Diabetic Chinese Hamsters

Nature 258 No.5531, 154 (1975)

36. Helmreich E.J.M.

Die Übersetzung der Hormonrezeptorwirkung
in biologische Funktion

Münch.med.Wschr. 117,1215 - 20 (1975)

37. Houslay M.D., Hesketh G.R., Smith G.A.
Warn G.B., Metcalfe J.C.

The Lipid Environment of the Glucagon
Receptor Regulates Adenyl Cyclase Activity

Biochem.Biophys. Acta 436, 495 - 504 (1976)

38. Jarrett L., McKeel D.W.

The Distribution and Characterization
of ATPase Activity of Isolated Fat Cells

Arch. Biochem Biophys.140, 362 - 370 (1970)

39. Jefferson S.L., Exton J.H., Butcher R.W.,
Sutherland E.W., Park C.R.

Role of Adenosin 3':5'-Monophosphate in the
Effects of Insulin and Anti-Insulin Serum on
Liver Metabolism

J.Biol.Chem. 243, 1031 - 38 (1968)

40. Johnson R., Sutherland E.W.

Detergent-dispersed Adenylate Cyclase
from Rat Brain

J.Biol.Chem. 248, 5114 - 19 (1973)

41. Johnson R., Pilakis S., Hamet P.

Liver Membrane Adenylate Cyclase
Synergistic Effects of Anions on Fluoride,
Glucagon and Guanylnucleotide Stimulation

J.Biol.Chem. 250, 6599 - 6607 (1975)

42. Katsilambros N.G., Rahman A., Hinz M.
Fussgänger R.D., Schröder K.E., Straub K.
Pfeiffer E.

Action of Streptozotocin and Insulin and
Glucagon Responses of Rat Islets

Horm.Metabolic Res. 2, 268 - 278 (1970)

43. Kimura N., Nagata N.

The Requirement of Guanine Nucleotides
for Glucagon Stimulation of Adenylate
Cyclase in Rat Liver Plasma Membranes

J.Biol.Chem. 252, 3829 - 35 (1977)

44. Koerker O.L., Ruch W., Chideckel E.,
Palmet J.

Somatostatin Hypothalamic Inhibitor
of the Endocrine Pancreas

Science 184, 482 - 84

45. Lavine R.L., Voyles N., Recant L.,
Perrino P.V.,

The Effect of Fasting on Tissue Cyclic
AMP and Plasma Glucagon in the Obese
Hyperglycemic Mouse Endocrinology 97,
615 - 20 (1975)

46. Laudat M.H., Pairault J.

An Impaired Response of Adenylate Cyclase
to Stimulation by Epinephrine in Adipocyte
Plasma Membranes from Genetically Obese
Mice (ob/ob)

Eur.J.Biochem. 56, 583 - 89 (1975)

47. Lilienfeld-Toal H.v., Mackes K.G. Laudage G.,
Willms B.

Plasma cAMP and Renin in Diabetes During
Insulin Induced Hypoglycemia

Horm.Metab.Res. 8, 491

48. Liljenquist J.E., Bombay J.D., Lewis S.B.,
Sinclair-Smith B.C., Felts P.W., Lacy W.W.
Crofford O.B., Liddle G.W.

Effect of Glucagon on Net Splanchnic Cyclic
AMP Production in Normal and Diabetic Man

J.of Clin.Invest. 53, 198 - 204 (1974)

49. Loten E.G., Sneyd J.G.T.

An Effect of Insulin on Adipose Tissue
Adenosin 3':5' cyclic Monophosphate
Phosphodiesterase

Biochem.J. 120, 187 - 193 (1969)

50. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.,
Randall R.J.

Determination of Protein with the Folin-
Reagent

J.Biol.Chem. 193, 265 - 275 (1951)

51. Madson N.S., Engquist A., Badawi J.,
Kehlet H.

Cyclic AMP, Glucose and Cortisol in Plasma
during Surgery

Horm.Metab .Res. 8 483 - 485 (1976)

52. Marinetti G.V., Ray T.K., Tomasi V.,

Glucagon and Epinephrine Stimulation of
Adenyl Cyclase in Isolated Rat Liver
Membranes

Biochem.Biophys. Res. Comm. 36 185 - 197 (1969)

53. Menahan L.A., Wieland O.

Interaction of Glucagon and Insulin on the
Metabolism of Perfused Livers from Fasted Rats
Eur.J. Biochem. 9, 55 - 70 (1969)

54. Mitchell R.H., Hawthorne J.N.

The Site of Diphosphoinositide Synthesis in
Rat Liver
Biochem.Biophys.Res.Comm. 21, 4 333 - 338
(1965)

55. Moxley M.A., Allen DD.

Effects of Glucagon, Phosphodiesterase
Inhibitors and Trypsin Treatment on Cyclic
3':5' Adenosine Mono-Phosphate Levels in
Isolated Hepatocytes
Horm. Metab. Res. 7, 330 - 334 (1975)

56. Müller W.A., Faloona G.R., Unger R.H.

Effect of Experimental Insulin Deficiency
on Glucagon Secretion
J. Clin. Invest. 50, 1992 - 99 (1971)

57. Neville D.M.

The Preparation of Liver Cell Membranes
J. Biophys. Biochem. Cyt. 8, 413 - 22
(1968)

58. Nichols W.K., Goldberg N.D.

The Relation ship between Insulin and
Apparent Glucocorticoid-Promoted Activation
of Hepatic Glycogen Synthetase
Biochem Biophys. Acta 279, 245 - 59 (1972)

59. Pennington F.,

Bi ochemistry of Dystrophic Muscle
Mitochondrial Succinate Tetrazolium-
Reductase and Adenosine-Triphosphate
Biochem.J. 80, 649 - 654 (1961)

60. Pfeuffer T., Helmreich E.J.M.
Activation of Pigeon Erythrocyte Membrane
Adenylate Cyclase by Guanylnucleoti de
Analogues and Separation of a Nucleotide
Binding Protein
J.Biol.Chem. 250, 867 - 876 (1975)
- 61a. Pilgis S.J., Exton J.H., Johnson R.H.,
Park C.R.
Effects of Insulin and Glucagon on cAMP Meta-
bolism in Livers from Diabetic Rats
Fed. Proc. 32, 299 (1973)
- 61b. Pilgis J.S., Exton J.H., Johnson R.A.,
Park C.R.
Effects of Glucagon on Cyclic AMP and
Carbohydrate Metabolism in Livers from
Diabetic Rats
Biochem. Biophys. Acta 343, 250 - 67
(1974)
62. Pauk G.L., Reddy W.G.
Evaluation of the Liver Adenosine
3':5' Monophosphate Response to
Glucagon
Diabetes 20, 129 - 133 (1971)
63. Pohl S.J., Birnbaumer L., Rodbell M.
The Glucagonsensitive Adenyl Cyclase
System in Plasma Membranes of Rat Liver
I Properties
J. Biol.Chem. 246, 1849 - 56 (1971)
64. Rakieten N., Rakieten M.L., Nadkarni M.V.,
Studies on the Diabetogenic Action of
Streptozotocin
Cancer Chemoth. Rep. 29, 91 - 98 (1963)

65. Rabinovitch A., Renold E.A., Cerasi E.

Decreased Cyclic AMP and Insulin Responses
to Glucose in Pancreatic Islets of Diabetic
Chinese Hamsters

Diabetologia 12, 581 - 87 (1976)

66. Ray, TK.

A Modified Method for the Isolation of the
Plasma Membrane from Rat Liver

Biochem.Biophys. Acta 196. 1-9

67. Rodbell M., Lin C.L., Salomon Y.

Evidence for Interdependent Action of
Glucagon and Nucleotides on the Hepatic
Adenylate Cyclase System

J.Biol.Chem. 249, 59 - 65 (1974)

68. Rodbell M., Londos C.

Regulation of Hepatic Adenylate Cyclase
System by Glucagon, GTP, Divalent Cations
and Adenosine

Metabolism 25 1347 - 49 (1976)

69. Schein P.S., Alberti K.G., Williamson D.H.

Effects of Streptozotocin on
Carbohydrate and Lipid Metabolism in the Rat
Endocrinology 89, 827-34 (1971)

- 70a. Salomon Y., Londos C., Rodbell M.

A Highly Sensitive Assay of Adenylate
Cyclase

Analytical Biochemistry 58, 541 - 48
(1974)

- 70b. Salomon Y., Rodbell M.

Evidence for Specific Binding Sites for
Guanylnucleotides in Adipocyte and
Hepatocyte Plasma Membranes

J. Biol.Chem. 250, 7245 - 50 (1975)

72. Selawry H., Gutmann R., Fink G.,
Recant L.

The Effect of Streptozotocin on Tissue
Adenosine 3':5' Monophosphate Levels

Biochem.Biophys.Res. Comm. 51
198 - 204 (1973)

73. Senft G., Schulz G., Munske K., Hoffmann H.

Influence of Insulin on Cyclic 3':5' AMP
Phosphodiesterase Activity in Liver Skeletal
Muscle Adipose Tissue and Kidney

Diabetologi 4,322 - 329 (1968)

74. Sakurai H., Dobbs R.E., Unger R.H.

The Role of Glucagon in the Pathogenesis of the Endoge-
nous Hyperglycemia of Diabetes Mellitus

Metabolism 24, 1287 - 97 (1975)

75. Sherwin R.S., Fischer M., Heder R. Felig P.

Hyperglucagonemia and Blood Glucose Regulation
in Normal, Obese, and Diabetic Subjects

N.Engl.J.Med. 294, 455 - 61 (1976)

76. Stalmans W.

Comments to Control of Adenylate Cyclase
Activity by Insulin and Insulinlike
GrowthFactor

Hormone and Cell Regulation 2,127 (1978)

77. Sutherland E.W., Rall T.W.

Adenylate Cyclase
Pharmacol. Rev. 12,26 -40 (1960)

78. Sutherland E.W., Rall T.W., Menon T.

Adenylate Cyclase, Distribution,
Preparation, Properties

J.Biol.Chem. 237, 1220 - 27 (1962)

79. Sutherland E.W., Butcher R.W., Robison G.A.,
Hardman J.G.

The Role of Adenosine 3':5' Monophosphate in
Hormone Action

Colloq.Ges.Physiol.Chem.Mosbach 1967

Karlson P. Hrsg. Springer Verlag 1967, S. 1

80. Sutherland F.W. Robison GGAA., Butcher R.W.

Some Aspects of the Biological Role of
Adenosine 3':5' Monophosphate (Cyclic
AMP)

Circulation 37, 279 - 306 (1968)

81. Thompson W.J., Little S.A., Williams R.H.

Effect of Insulin and Growth Hormone on
Rat Liver Cyclic Nucleotide Phospho-
diesterase

Biochemistry 12, 1889 - 94 (1973)

82. Toda G., Oka H., Oda T., Ikeda J.

Subfraction of Rat Liver Plasma Membrane
Uneven Distribution of Plasma Membrane-
Bound Enzymes on the Liver Cell Surface

Biochem.Biophys. Acta 413, 52 - 64 (1975)

83. Tria E., Scapin S., Cocco C. Lully P.

Insulin-Sensitive Adenosine 3':5' Cyclic
Monophosphate Phosphodiesterase of
Hepatocyte Plasma Membrane

Biochem.Biophys. Acta 496, 77 - 87 (1976)

84. Unger R.H., Aguillar-Parada E.,
Müller W.A., Eisentraut A.M.

Studies of Pancreatic Alpha Cell Function
in Normal and Diabetic Subjects

J.Clin. Invest 49 837 (1970)

85. Unger R.H., Orci D.

The Essential Role of Glucagon in the
Pathogenesis of Diabetes Mellitus

Lancet I 14 - 16, (1975)

86. Van den Berghe W.

Regulation by Intracellular Cyclic Nucleotides
Eucaryotic Cell Function and Growth,
Plenum Publ. New York, 1976, S. 807

87. Vesely D.L., Castro A., Levey G.S.

Decreased Rat Hepatic Guanylate Cyclase
Activity in Streptozotocin Induced
Diabetes mellitus
Diabetes, 26, 308 - 13 (1977)

88. Wagle S.R., Ingebretsen W.R., Sampson S.

Studies on Gluconeogenesis, Protein
Synthesis and cAMP Levels in Isolated
Hepatocytes from Alloxan Diabetic Rats
Diabetologia 11, 411 - 17 (1975)

- 89.. Wasner H.K.

Regulation of Proteinkinase and Phospho-
protein Phosphatase by Cyclic AMP and
Cyclic AMP Antagonist
FEBS Letters 57, 60 - 63 (1975)

90. Wasner H.K.

Distinction between Adenylate Cyclase
Stimulated by Different Hormones in Rat
Liver Cells
Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 357, 285 (1976)

91. Whitig P., Bowley M., Starton G.,
Haydn-Pritchard P., Bridley D.,
Hawthorne J.N.

The Effect of Chronic Diabetes Induced by
Streptozotocin on the Activities of Some
Enzymes of Glycerolipid Synthesis in Rat
Liver
Biochem. J. 168, 147 - 153 (1977)

92. Yerganian G., Meier M.
Spontaneous Hereditary Diabetes Mellitus
in the Chinese Hamster (*Cricetulus griseus*)
Fed.Proc. 18,514 - 18 (1959)
93. Zapf J., Feuerlein D., Waldvogel M.
Froesch E.R.
Increased Sensitivity of Diabetes Rat
Adipose Tissue towards the Lipolytic
Action of Epinephrine
Diabetologia 11, 509 - 16 (1975)
94. Zumstein P., Waldvogel M., Zapf J.
Increased Sensitivity of Lipolysis and
of Protein Kinase Activation to Epi-
nephrine in Fat Cells from Diabetic Rats
Diabetologia 13, 442, Abstract No. 349
(1977)
95. Soman V., Felig P.
Glucagon Binding and Adenylate Cyclase
Activity in Liver Membranes From
Untreated and Insulin Treated Diabetic Rats
J. Clin Invest. 61, 552 - 60 (1978)

D A N K S A G U N G

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privat-Dozent Dr. med. K.D. Hepp, für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hinweise, die er mir während der Abfassung vorliegender Arbeit stets freundlicherweise gegeben hat.

Herrn Dr. W. Bachmann möchte ich für die zahlreichen Tips sowie für die Bereitstellung der Membranen und die klinischen Daten danken.

Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Diabetesforschung für die mir geleistete Hilfe.

L E B E N S L A U F

Hubert A l l g a y e r

geboren: : 29. Februar 1948 in Dillingen/Do.

Eltern : Dr. jur. Alois Allgayer,
Notar i.R.
Gertraud Allgayer, geb. Hogen

Schulen : 1954 - 1958
Albertus Magnus - Volksschule
in Lauingen/Do.
1958 - 1967
Johann-Michael-Sailer Gymnasium
in Dillingen/Do.

Universität : 1969 - 1974
Studium der Biologie an der
Techn. Universität München

Diplom : 1974 Dipl.Biol.
Fachrichtung Mikrobiologie
1972 - 1978
Studium der Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Staatsexamen : 1975: I Teil; 1977:II. Teil
1978: III Teil

Promotion : Die vorliegende Arbeit wurde unter
Anleitung von Herrn Priv.Do. Dr.med.K.D. Hepp am Institut für
Diabetesforschung angefertigt.

